

Enzymatischer Abbau des Lignocellulosekomplexes in Energiepflanzen unter besonderer Berücksichtigung der Silierung und der Biogasproduktion

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Lebensmittelchemikerin Ulrike Schimpf

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Stefan Hecht, Ph.D.

Gutachter:

1. Prof. Dr. Wolfgang Lockau
2. Prof. Dr. Günter Westphal
3. Prof. Dr. Bernd Linke

Tag der mündlichen Prüfung: 31.01.2014

Meinen Eltern

„Es zeichnet einen gebildeten Geist aus, sich mit jenem
Grad an Genauigkeit zufrieden zugeben, den die
Natur der Dinge zulässt, und nicht dort Exaktheit zu
suchen, wo nur Annäherung möglich ist.“

Aristoteles

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungs- und Symbolverzeichnis.....	V
Kurzfassung	IX
Abstract	X
1 Einleitung und Zielstellung	1
2 Theoretische Grundlagen	4
2.1 Struktur von zellulären Polymeren pflanzlicher Herkunft	4
2.1.1 Cellulosen, Hemicellulosen, Lignine	4
2.1.2 Lignocellulosekomplexe in Energiepflanzen	9
2.2 Abbau von Lignocellulosen	12
2.2.1 Hydrolyse und Oxidation von Lignocellulosen	13
2.2.2 Abbau von Lignocellulosen mittels mikrobieller Enzyme	15
2.3 Silierbarkeit und Silagequalität von Energiepflanzen.....	20
2.3.1 Silagen - Herstellung, Qualitätsmerkmale	20
2.3.2 Auf die Produkte und Prozessstabilität Einfluss nehmende Milieu-bedingungen und Silierzusätze	22
2.4 Methangasgewinnung	24
2.4.1 Biogasprozess - Verfahren, biochemische Abbauprozesse, Einflussfaktoren	24
2.4.2 Inokulum - Aktivierung und Inhibierung der Methanbildung	28
2.4.3 Biopolymere als C-Quelle.....	29
3 Material und Methoden.....	33
3.1 Laborgeräte	33
3.2 Materialien	34
3.2.1 Energiepflanzen	34
3.2.2 Modellsubstrate	35
3.2.3 Enzympräparate	36
3.2.4 Pilzsubstrate	38
3.2.5 Inokulum	40
3.3 Methoden	40
3.3.1 Bestimmung der Enzymaktivitäten	40
3.3.1.1 Nachweis der Cellulase-, Hemicellulase- und Pektinaseaktivität	40
3.3.1.1.1 DNSS-Methode.....	40

3.3.1.1.2	Filterpapier-Methode	42
3.3.1.2	Nachweis der Laccaseaktivität	43
3.3.1.3	Nachweis von Enzymaktivitäten ausgewählter Pilzsubstrate	44
3.3.2	Chemische Zusammensetzung der Energiepflanzen, Pilzsubstrate, Gärprodukte und Inokula	45
3.3.2.1	Erweiterte Futtermittelanalyse	45
3.3.2.2	Analyse flüchtiger Verbindungen	48
3.3.2.3	Bestimmung des Gehaltes an reduzierenden Kohlenhydraten	51
3.3.3	Bestimmung der Qualitätsparameter von Silagen	51
3.3.4	Berechnungsgrundlagen zur Bestimmung des Abbaugrades von Lignocellulose	54
3.3.4.1	Abbauleistung während der Silierung	54
3.3.4.2	Abbauleistung während des Eudiometer-Gärtests	55
3.3.5	Verfahren zur Bestimmung des spezifischen Biogas- und Methanertrages	56
3.3.5.1	Eudiometer-Gärtest	56
3.3.5.2	Berechnungsgrundlagen	58
4	Ergebnisse und Diskussion	60
4.1	Chemische Zusammensetzung der Rohstoffe	60
4.1.1	Mais der Erntejahre 2005 und 2006	60
4.1.2	Roggen der Erntejahre 2006 und 2007	61
4.1.3	Vergleich der Energiepflanzen unterschiedlicher Erntejahre	62
4.2	Aktivitäten der Lignocellulose abbauenden Enzympräparate	63
4.3	Auswahl von Enzymen	67
4.4	Methodik der Enzymzugabe	68
4.4.1	Enzymatische Behandlung der Rohstoffe während der Silierung	68
4.4.2	Enzymatische Behandlung der Silagen direkt vor dem Biogasprozess	70
4.4.3	Enzymatische Behandlung der Silagen während des Biogasprozesses	71
4.5	Silierung der Rohstoffe Mais und Roggen	71
4.5.1	Aufbereitung der Energiepflanzen	71
4.5.2	Chemische Zusammensetzung der Silagen	72
4.5.2.1	Maissilage der Erntejahre 2005 und 2006	72
4.5.2.2	Roggensilage der Erntejahre 2006 und 2007	75
4.5.3	Gärverluste in Abhängigkeit von der Zeit	77
4.5.4	Zeitabhängiger Abbau von Rohstoff-Komponenten während der Silierung	78
4.5.5	Vergleich der Silagequalität	79

4.6	Enzymatische Behandlung der Rohstoffe während der Silierung.....	80
4.6.1	Chemische Zusammensetzung der Silagen mit Enzymadditiven	80
4.6.1.1	Maissilage des Erntejahres 2005	80
4.6.1.2	Maissilage des Erntejahres 2006.....	83
4.6.1.3	Roggensilage des Erntejahres 2006	84
4.6.1.4	Roggensilage des Erntejahres 2007	85
4.6.2	Abbauverhalten der Lignocellulose	87
4.6.3	Einfluss des Enzymzusatzes auf die Silagequalität.....	95
4.7	Enzymatische Behandlung der Silage direkt vor dem Biogasprozess	105
4.7.1	Chemische Zusammensetzung der Silage mit Enzymadditiven	105
4.7.2	Anteil an reduzierenden Kohlenhydraten vor und nach der Behandlung	105
4.7.3	Abbauverhalten der Lignocellulose	106
4.7.4	Einfluss des Enzymzusatzes auf die Silagequalität.....	108
4.8	Enzymatische Behandlung der Silagen während des Biogasprozesses	108
4.8.1	Abbauverhalten der Lignocellulose	108
4.9	Eudiometer-Gärtests.....	111
4.9.1	Inokulum	111
4.9.1.1	Chemische Zusammensetzung des Inokulums	111
4.9.1.2	Vergleich der spezifischen Methanerträge der Inokula	113
4.9.2	Gärsubstrate	114
4.9.2.1	Spezifische Biogas- und Methanerträge der Rohstoffe.....	114
4.9.2.2	Spezifische Biogas- und Methanerträge der während der Silierung enzymatisch behandelten Silagen	115
4.9.2.3	Spezifische Biogas- und Methanerträge der direkt vor dem Biogasprozess enzymatisch behandelten Silage	126
4.9.2.4	Spezifische Biogas- und Methanerträge der während des Biogasprozesses enzymatisch behandelten Silagen	131
4.9.2.5	Abbauverhalten der Lignocellulose während der Methanisierung	137
4.9.2.6	Cellulose als Indikator der Vergärbarkeit von Energiepflanzen	142
4.9.2.7	Einfluss der Methodik der enzymatischen Behandlung auf den Biogasprozess.....	146
4.9.2.8	Einfluss der chemischen Substratzusammensetzung auf die Methanausbeute	154
4.9.2.9	Einfluss der Silierung auf die Methanausbeute.....	158
4.9.2.10	Einfluss der Häcksellänge der Rohstoffe auf die Methanausbeute	160
4.9.2.11	Beurteilung des Biogasprozesses auf Basis der mikrokristallinen Cellulose	162

4.10	Versuche zur Optimierung des Biogasprozesses bei gegebenen Rohstoffen	163
4.10.1	Einsatz von Pilzabprodukten aus der Pilzzüchtung	163
4.11	Wirtschaftlichkeitsbetrachtung	170
5	Weiterführende Arbeiten	171
6	Zusammenfassung.....	172
	Summary.....	174
7	Literaturverzeichnis.....	176
8	Anhang	194
8.1	Enzymatische Vorbehandlung von Biogassubstraten	194
8.2	Chemische Zusammensetzung der Rohstoffe, Silagen und Gärrückstände.....	197
8.2.1	Erweiterte Futtermittelanalyse	197
8.2.2	Flüchtige Bestandteile.....	219
8.2.3	Analytik von flüchtigen Bestandteilen.....	222
8.3	Massen- und Gärverluste	223
8.4	Biogassummenkurven.....	227
8.5	Abbaugrade ausgewählter Inhaltsstoffe	233
8.6	Enzymaktivitäten	235
8.7	Statistische Auswertung.....	239
8.8	Wirtschaftlichkeitsbetrachtung	241
	Danksagung.....	XI
	Publikationsliste	XII
	Selbstständigkeitserklärung	XIV

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Abkürzungen	Bedeutung
AG	Arabinogalactan
Ara	Arabinose
AS	Austernseitling
AX	Arabinoxylan
BS	Buttersäure
C	Kohlenstoff
CH ₄	Methan
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CS	Capronsäure
DMP	Dimethoxyphenol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNSS	Dinitrosalicylsäure
E	Enzym
el	elektrisch
ES	Essigsäure
F	Verdünnungsfaktor
FID	Flammenionisationsdetektor
FM	Frischmasse
FP	Filterpapier
GA	Gesamtalkohol
gem	gemessen
ges	gesamt
GC	Gaschromatographie
Glc	Glucose
GM	Glucomannan
GPS	Ganzpflanzensilage
GS	Gesamtsäure
GT	Glycosyltransferase
GU	Guaiacol
H	Wasserstoff
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie: High Performance Liquid Chromatography
k.A.	keine Angabe
k.B.	keine Berechnung
KBE	Koloniebildende Einheit
k.M.	kein Mehrertrag
KHG	Kohlenhydratgehalt
korrr	korrigiert
Man	Mannose
Max	Maximum
MCC	Mikrokristalline Cellulose: Micro-Crystalline Cellulose
Min	Minimum
MiS	Milchsäure

Mn	Mangan
MS	Maissilage
MW	Mittelwert
N	Stickstoff
Na-CMC	Natrium-Carboxymethylcellulose
NEL	Netto-Energie-Laktation
NH ₃	Ammoniak
NH ₄ -N	Ammonium-Stickstoff
n.n.	nicht nachweisbar
NO ₃	Nitrat
n.s.	nicht signifikant
O/O ₂	Sauerstoff
oTS	Organische Trockensubstanz
P	Pasteurisieren
PE	Pektin
PK	Pufferkapazität
PS	Propionsäure
RID	Brechungsindexdetektor: Refractive Index Detector
rKH	Reduzierende Kohlenhydrate
RS	Roggensilage
S	Schwefel
ST	Shiitake
TiO ₂	Titandioxid
TS	Trockensubstanz
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volumen
VE	Veresterungsgrad
VarK	Variationskoeffizient
VK	Vergärbarkeitskoeffizient
VS	Valeriansäure
W	Wasser
WBC	Wasserbindungskapazität: Water Binding Capacity
WSC	Wasserlösliche Kohlenhydrate: Water Soluble Carbohydrates
XG	Xyloglucan
Xyl	Xylose

Symbole	Einheit	Bedeutung
A 1	-	Cellulase, Produkt: R32
A 2	-	Cellulase, Produkt: R31
A 3	-	Cellulase, Produkt: 30430
ADF	[% i.TS]	Acid Detergent Fiber, Anteil an Cellulose und Lignin
ADL	[% i.TS]	Acid Detergent Lignin, Anteil an Lignin
AG _B	[%]	Abbaugrad bezogen auf das Biogassubstrat
AG _F	[%]	Abbaugrad bezogen auf den Faulschlamm

AG _S	[%]	Abbaugrad bezogen auf das Siliersubstrat
a _H	[U/g]	Enzymaktivität einer Hydrolase
a _O	[U/ml]	Enzymaktivität einer Oxidoreduktase
B 1	-	Pektinase, Produkt: Rapidase [®] TF
B 2	-	Hemicellulase, Produkt: Filtrase [®] BR
B 3	-	Cellulase, Produkt: Cytolase [®] CL
B 4	-	Pektinase, Produkt: Rapidase [®] ADEX P
B _{AM}		Gerüstsubstanzengehalt im Substrat nach dem Biogasprozess bezogen auf FM
B _{FM}	[g]	Gerüstsubstanzengehalt im Faulschlamm nach dem Biogasprozess bezogen auf FM
B _{GM}	[g]	Gerüstsubstanzengehalt in der Gesamtmasse aus Substrat und Faulschlamm nach dem Biogasprozess bezogen auf FM
B _{PM}	[g]	Gerüstsubstanzengehalt im Substrat vor dem Biogasprozess bezogen auf FM
C 1	-	Cellulase, Produkt: Metha <u>Plus</u> [®] L100
C 2	-	Pektinase, Produkt: Pektinase L100
DI	[%]	Differenz
ΔE	-	Extinktionsdifferenz zwischen Analysen- und Blindwert
G _V	[%]	Gärverlust
L	-	Laccase C
m	[g]	Einwaage
M	[g/mol]	Molare Masse
M _{BG}	[g]	Gesamtmasse aus Substrat und Faulschlamm nach dem Biogasprozess
M _{BPE}	[g]	Masse des Substrates/Faulschlammes vor dem Biogasprozess
M _G	[g]	Masse des Glases
M _{GPA}	[g]	Gesamtmasse aus Glas und Substrat beim Auswägen
M _{GPE}	[g]	Gesamtmasse aus Glas und Substrat beim Einwägen
M _{PA}	[g]	Masse des Substrates nach dem Silierprozess
M _{PE}	[g]	Masse des Substrates vor dem Silierprozess
M _V	[g/kg]	Massenverlust
n	-	Anzahl der Stichproben
NDF	[% i.TS]	Neutral Detergent Fiber, Anteil an Gerüstsubstanzen
NDF _A	[% i.TS]	Gerüstsubstanzengehalt im Substrat nach dem Silierprozess
NDF _{BE}	[% i.TS]	Gerüstsubstanzengehalt im Substrat/Faulschlamm vor dem Biogasprozess
NDF _{BG}	[% i.TS]	Gerüstsubstanzengehalt in der Gesamtmasse aus Substrat und Faulschlamm nach dem Biogasprozess
NDF _{BGF}	[% i.TS]	Gerüstsubstanzengehalt im Faulschlamm nach dem Biogasprozess
NDF _E	[% i.TS]	Gerüstsubstanzengehalt im Substrat vor dem Silierprozess
p	[mbar]	Druck
p ₀	[mbar]	Normdruck (1013,25)
P _E	[g/l]	Probeneinwaage pro Liter Weckglas
p _W	[mbar]	Dampfdruck des Wassers bei Umgebungstemperatur
r	-	Korrelationskoeffizient
R ²	-	Bestimmtheitsmaß

r_{AEgem}	[cmWS]	Abstand zw. Ausgleichsgefäßaufhängung und Eudiometernullpunkt
r_{AGgem}	[cmWS]	Abstand zw. Ausgleichsgefäßaufhängung und -wasserspiegel
r_{EEgem}	[cmWS]	Abstand zw. Eudiometernullpunkt und Eudiometerskalenwert 200 ml
s	-	Standardabweichung
t	[min]	Inkubationszeit
T	[K]	Temperatur
T_0	[K]	Normtemperatur (273,15)
TS_A	[g oder %]	Trockensubstanzgehalt im Substrat nach dem Silierprozess
TS_{BE}	[%]	Trockensubstanzgehalt im Substrat/Faulschlamm vor dem Biogasprozess
TS_{BG}	[%]	Trockensubstanzgehalt in der Gesamtmasse aus Substrat und Faulschlamm nach dem Biogasprozess
TS_{BGF}	[%]	Trockensubstanzgehalt im Faulschlamm nach dem Biogasprozess
TS_E	[g oder %]	Trockensubstanzgehalt im Substrat vor dem Silierprozess
V_{BG}	[ml]	Biogasnormvolumen aus Substrat und Inokulum
x	[μ mol/ml]	Konzentration an Glucoseäquivalenten
XA	[% i.TS]	Rohasche
XF	[% i.TS]	Rohfaser
XL	[% i.TS]	Rohfett
XP	[% i.TS]	Rohprotein
XX	[% i.TS]	N-freie Extraktstoffe
ρ	[kg TS/m ³]	Dichte

Kurzfassung

In den Pflanzenzellwänden befindliche Polysaccharide stehen dem Prozess nur bedingt als Energiequelle zur Verfügung, da diese in einem Komplex mit Lignin verknüpft sind. Um diese Substanzen für den Biogasprozess verfügbar zu machen und demnach den Substratumsatz bzw. die Prozesseffizienz zu erhöhen, sind geeignete Stoffe oder Techniken einzusetzen bzw. zu entwickeln. In dieser Arbeit wurde zielführend der Einsatz von unterschiedlichen Enzympräparaten in drei verschiedenen Prozessstufen bei ausgewählten Energiepflanzen mit variierender Hacksellänge untersucht. Anhand von Enzymaktivitätsbestimmungen konnten Enzympräparate für die einzelnen Stufen selektiert werden. Die ausgewählten Enzyme wurden einzeln oder in Mischung während der Silierung, direkt vor dem Biogasprozess sowie während des Biogasprozesses zum Substrat dotiert und dieses nach der jeweiligen Vorbehandlung in Batch-Gärtests vergoren. Neben der Biogas- und Methanausbeute wurde zur Bewertung der Enzymleistung der Abbau an Lignocellulose sowie die Freisetzung an niedermolekularen Kohlenhydraten ermittelt. Zusätzlich wurde das Quellen der Lignocellulose mit Hilfe eines Wasserzusatzes in Form einer Vorhydrolyse als Vorbehandlungsmethode mit allgemein positivem Ergebnis geprüft.

Das Ziel der verbesserten Substratumsetzung bei Mais und Roggen und folglich einer Erhöhung der Biogasproduktion wurde durch den Zusatz ausgewählter Enzympräparate erreicht. Es konnten Grundlagen bezüglich der Wirkung von Enzymen in Biogasprozessen geschaffen werden, anhand derer deutlich wurde, dass besonders die enzymatische Behandlung in den der Methanisierung vorgelagerten Prozessstufen weiterzuentwickeln ist.

Abstract

Polysaccharides of plant cell walls are of limited digestibility due to their cross-linking to lignin. In order to make the molecules available for the biogas process and thus increase the substrate utilization and process efficiency appropriate substances or techniques are needed. It was therefore the aim of this work to investigate the effects of different enzyme preparations in three digestion process stages. Selected energy plants with varying degrees of particle sizes (chopping lengths) were used as digester feedstock. Enzyme preparations for the different process stages were chosen by enzyme assays. The selected enzymes were added to the feedstock during the ensiling, directly before the biogas process or during the biogas process separate or in mixtures. Pre-treated substrates were subsequently digested in batch fermentation tests. Beside the biogas and methane yield the degradation degree of lignocellulose and the release of low-molecular carbohydrates were investigated for evaluating the enzyme performance. Additionally, the swelling of lignocellulose caused by addition of water in a pre-hydrolysis process was examined as a method of pre-treatment, with generally positive results.

The aim of an improved substrate conversion of maize and rye and thus an enhanced biogas production by enzymatic pretreatments was achieved. Scientific fundamentals regarding the impact of enzymes on biogas processes were established. Enzymatic pretreatments in process steps before methanation showed potential for further developments.

1 Einleitung und Zielstellung

Im Biogasprozess werden organische Stoffe wie Kohlenhydrate, Proteine und Lipide während einer anaeroben Vergärung hauptsächlich zu Methan umgesetzt. Dieses Gas kann in weiteren Prozessstufen verstromt werden. Bei dem anaeroben Abbau der Biomasse zu Biogas wird ein vierstufiger Prozess durchlaufen: (1) Hydrolyse, (2) Acidogenese, (3) Acetogenese sowie (4) Methanbildung. [Linke *et al.*, 2011] Dabei limitiert der Substrataufschluss über die Hydrolyse den Gesamtumsatz der Biomasse. Eine nahezu vollständige Umsetzung der Biomasse wird nur bei strukturarmen Stoffen wie z. B. einfachen Zuckern erreicht. Die in den Pflanzen enthaltenen Gerüstsubstanzen wie Cellulose, Hemicellulose und Lignin limitieren die anaerobe Konversion [Taherzadeh & Jeihanipour, 2012]. Die genannten Biopolymere sind die bedeutendste regenerative Quelle der Biomasse, stellen neben Stärke die mengenmäßig stärkste Fraktion der organischen Substanz dar und können als Energiequelle für die anaerobe Vergärung dienen. Da die Biopolymere nativ in einer starren komplexartigen Struktur vorliegen, dem Lignocellulosekomplex, können diese nur partiell von den im Biogasprozess vorhandenen Mikroorganismen degradiert werden. Cellulose sowie Hemicellulose selbst sind in reiner Form zu großen Teilen anaerob abbaubar. Sind diese Moleküle jedoch, wie schon angemerkt, an Lignin gebunden, nimmt die Abbaubarkeit ab.

Um die einzelnen Polysaccharide wie Cellulose, Hemicellulose und im Komplex gebundenes Pektin für eine anaerobe Vergärung im Biogasprozess zugänglich zu machen und somit leicht vergärbare Moleküle wie Mono- und Oligosaccharide für die Biomethanisierung bereitzustellen, werden in Biogasanlagen u. a. Enzympräparate als biologische Vorbehandlungsmaßnahme eingesetzt. Dadurch können die erzielbaren Energiemengen von Energiepflanzen erhöht werden. [Stamatelatou *et al.*, 2012] Bisher standen dabei Cellulasen im Vordergrund. Die Wirkung der Enzympräparate wurde bislang hauptsächlich empirisch ermittelt. Zur Darstellung der Enzymleistung dient in den meisten Fällen der Biogas- und Methanertrag bzw. die Stromproduktion. Grundlagen zum Verständnis der Enzymleistung auf stofflicher Ebene liegen kaum vor.

Ein grundlegendes Verständnis enzymatischer Wirkmechanismen ist jedoch die Voraussetzung, um Mischungen von Enzympräparaten derart zu konfektionieren, dass Lignocellulosen in höherem Maße als bisher umgesetzt werden. Dazu muss durch experimentelle Untersuchungen geklärt werden, welche am Prozess des Lignocelluloseabbaus beteiligten Enzyme bzw. Enzymmischungen sich in stärkstem Maße auf den Polysaccharidabbau auswirken und inwieweit sich die Abbauvorgänge bzw. die Intermediate gegenseitig beeinflussen. Die so gewonnenen Daten können Basis sein, um durch Enzymapplikationen eine deutliche Steigerung des Substratum-

satzes zu erreichen. Für die Betreiber von Biogasanlagen ist diese Erhöhung des Substratumsatzes und damit die Steigerung des Energieertrages von entscheidender Bedeutung, da dies zu einer Minderung von Substratbereitstellungskosten und somit zu einem ökonomischen Vorteil führt. Insbesondere aufgrund steigender Substratpreise ist eine Optimierung des Substratumsatzes anzustreben. Könnte durch einen gesteigerten Substratumsatz mehr Strom je Flächeneinheit produziert werden, stehen mehr Flächen für alternative Kulturpflanzen oder für den Nahrungsmittelanbau zur Verfügung. Gelingt es durch den Enzymeinsatz, auch lignocellulolytische Verbindungen und Biopolymere für die Biogasgewinnung zu nutzen, kann zudem das Substratspektrum deutlich erweitert werden, was zu einer Auflockerung der Fruchtfolgen beim Anbau nachwachsender Rohstoffe beitragen kann.

Aus wissenschaftlichen Fachberichten über die Futtermittelherstellung ist bekannt, dass Enzyme beim Einsatz während der Silierung eine deutliche Wirkung auf den Faserabbau aufweisen sowie eine Freisetzung von niedermolekularen Kohlenhydraten bewirken können. [Colombatto *et al.*, 2004] Für die Mehrzahl der Enzympräparate herrschen während der Silierung bezüglich des pH-Wertes optimale Reaktionsbedingungen. Folglich ergibt sich die Frage, ob durch die Applikation von Enzympräparaten während der Silierung höhere Substratumsatzraten erzielt werden können, als beim Enzymeinsatz direkt im Biogasprozess. Die genannte Art der Enzymierung blieb bisher in der Biogasforschung nahezu unberücksichtigt. Ungeklärt ist *bis dato*, welche Wirkung eine Enzymzugabe auf die Massen- bzw. Energieverluste über die Konservierungszeit und letztendlich auf die Energieproduktion aufweist. Daher ist zu prüfen, wie sich Enzymzusätze auf die dem Biogasprozess vorgelagerten Prozesse auswirken. Auch eine Vorhydrolyse zur Schaffung optimaler Milieubedingungen sollte in die Untersuchungen einbezogen werden, um Empfehlungen für eine für die Enzymierung geeignete Prozessstufe ableiten zu können.

Weiterhin spielt bei der Zersetzung von organischen Substanzen die Art der Struktur der Pflanzen eine wesentliche Rolle. Für die Biogasnutzung ist ein Zerreiben, Auffasern oder Splissen krautiger röhrenartiger Pflanzen entscheidend [Wucher, 2005]. Strukturänderungen können ebenso durch Lösungsmittelzusätze erzielt werden. Fasern quellen auf, der Querschnitt verändert sich, und die Faserlänge verringert sich. [El Seoud *et al.*, 2008] Aufgrund dessen soll zur Lockerung der Faserstrukturen von ausgewähltem Pflanzenmaterial ein Wasserzusatz mit und ohne Enzymgabe zum Pflanzenmaterial vor dem Biogasprozess (Vorhydrolyse) untersucht werden, mit dem Ziel einer besseren Zugänglichkeit der Biopolymere für Mikroorganismen im Biogasprozess und einer damit verbundenen Verbesserung der Transportprozesse sowie einer Steigerung der Methanausbeute.

Da die anaerobe biologische Abbaubarkeit neben der Substratzusammensetzung von der Partikelgröße der Biogassubstrate abhängt [Izumi *et al.*, 2010], ist ferner die Frage des Einflusses verschiedener Häcksellängen auf die Biogasbildung von unbehandelten und enzymatisch behandelten Energiepflanzen zu beantworten. Zum Vergleich sollen praxisnahe Varianten mit einer Häcksellänge von 8 mm sowie mit einem neuartigen Häcksler (Prototyp) auf 4 mm zerkleinerte Rohstoffe angewendet werden.

Ziel der Arbeit ist eine Optimierung des Biogasprozesses durch einen gezielten, kostengünstigen, enzymatischen Aufschluss der Lignocellulose als Vorbehandlungsstrategie für Energiepflanzen. Dabei sollen vorrangig die neben Grassilage am häufigsten eingesetzten Biogassubstrate Mais und Roggen verwendet werden. Das Ziel einer Steigerung der Methanausbeute durch einen nahezu vollständigen Aufschluss der Biomasse unter Betrachtung der grundlegenden stofflichen und energetischen Umsetzungen zu erreichen, soll durch folgende Einzelschritte realisiert werden:

- Auswahl geeigneter technischer Enzympräparate zum Abbau von Lignocellulose (Cellulasen, Hemicellulasen, Pektinasen, Laccasen)
- Charakterisierung und Selektion der Enzympräparate mit Hilfe von Enzymaktivitätsmessungen
- Einsatz von Enzympräparaten bei ausgewählten Prozessstufen der Biogasgewinnung im Labormaßstab: während der Silierung, direkt vor dem Biogasprozess, während des Biogasprozesses
- Zugabe von Wasser bei der Vorbehandlung direkt vor dem Biogasprozess
- Prüfen der Wirkungsweise der einzelnen Enzympräparate oder Enzympräparatmischungen (u. a. Synergien, Hemmprozesse, Produktbildung)
- Charakterisierung des Abbauverhaltens der Lignocellulose während des gesamten Prozesses: Stoffbilanzierung

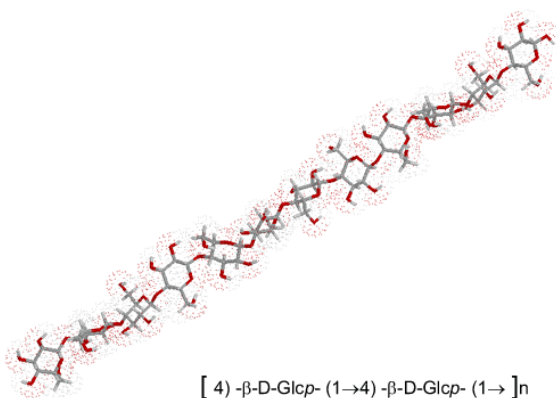
Zur enzymatischen Behandlung von Energiepflanzen werden neben biotechnologisch isolierten, kommerziellen Enzympräparaten neuartige Substrate mit einem weitreichenden Enzymspektrum zum Abbau von Lignocellulose während der Silierung und der Biogasproduktion eingesetzt. Zum Einsatz kommen enzymhaltige Abprodukte der Speisepilzproduktion. Danach dürfte es möglich sein, kommerzielle Enzympräparate durch ausgewählte Pilzsubstrate zu substituieren. Das Biorecycling der Abprodukte kann zu einer Reduktion der Einsatzmengen von Material und Energie für die technische Produktion von Enzympräparaten und folglich zu einer Steigerung der Ressourceneffizienz führen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Struktur von zellulären Polymeren pflanzlicher Herkunft

2.1.1 Cellulosen, Hemicellulosen, Lignine

Pflanzenzellen sind von Zellwänden umgeben, welche hauptsächlich aus Polysacchariden aufgebaut sind. Zellwand-Polysaccharide bilden koextensive Netzwerke und weisen eine enorme strukturelle Komplexität auf. Diese Saccharide bestehen aus mindestens 14 verschiedenen Monosacchariden. Eine Vielfalt an glycosidischen Bindungen verknüpfen die Monosaccharide in den verschiedenen Polysacchariden. Der zentrale Prozess der Polysaccharid-Synthese ist die Wirkung der Glycosyltransferasen (GT) oder Glycosylsynthasen. Diese Enzyme bilden glycosidische Bindungen durch die Anlagerung von Zuckerbausteinen bestimmter Donorsubstrate, hauptsächlich Nukleotid-Zucker, an spezifische Akzeptorsubstrate. Daher sind GTs am Einbau von nukleotid-aktivierten Zuckern in die wachsenden Glucanketten beteiligt.



β-D-Glcp = β-D-Glucopyranose

Abb. 2-1: Cellulosestruktur [nach Huber]

Cellulose ist das in den primären und sekundären Zellwänden hauptsächlich vorherrschende Polysaccharid mit hohem Polymerisierungsgrad und wird in der Plasmamembran synthetisiert. Es enthält bedeutende Energieressourcen, gespeichert in den C-H- und C-C-Bindungen. Cellulose besteht aus Glucose-Monomeren, welche durch glycosidische β-1,4-Verknüpfungen zu einem linearen Polymer zusammengefügt sind (Abb. 2-1). Durch die β-1,4-glycosidische Bindung ergibt sich eine

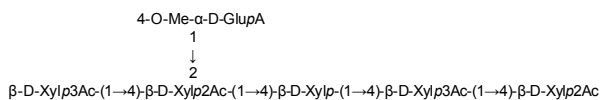
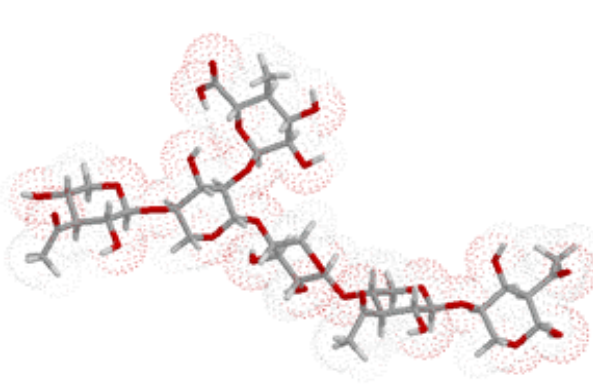
alternierende Drehung der Glucosemoleküle von 180 Grad um die Hauptachse des Cellulosemoleküles, wodurch eine Wiederholungseinheit im Molekül von 1 nm Länge mit der Bezeichnung Anhydrocellobiose entsteht. Die β-1,4-D-Glucan-Ketten (200 bis 15.000 Glucoseeinheiten), werden durch intra- und intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zu kristallinen Mikrofibrillen verknüpft. Bündel aus 50-100 Mikrofibrillen formen Makrofibrillen von ungefähr 0,5 µm Durchmesser und einer Länge von 4 µm. Es entsteht eine Hierarchie von Strukturen, die sich jeweils durch eine Längsstreckung auszeichnet. In der Cellulose wechseln sich hochkristalline Bereiche mit wenig bis nichtkristallinen Bereichen ab. Die sogenannten amorphen Bereiche werden z. B. leichter durch Säuren angegriffen. Cellulose weist wie andere Polysaccharide kein definiertes Molekulargewicht sondern eine Polydispersität auf, das heißt, sie ist aus Glucanketten variierender Kettenlänge zusammengesetzt. Cellulose dient der Pflanze im

Allgemeinen zur Ausbildung zugfester Faserstrukturen. Industriell werden Cellulosen und Cellulosederivate wie Cellulose-Nitrat, Cellulose-Acetat und Carboxymethyl-Cellulose zur Papierherstellung, in der Analytik (Chromatographie) und als Chemierohstoff (Lävulinsäure, Ascorbinsäure, Aceton, Ester, Polymere) verwendet. [Yu *et al.*, 2008; Matthews *et al.*, 2006; Scheible & Pauly, 2004; Blaschek, 1990; Gruber, 2007; Gruber, 2005b] Cellulosen sind in der Zellwand von Begleitsubstanzen wie Hemicellulose, Lignin und anderen Kohlenhydratpolymeren wie Pektin umgeben.

Die Produktion von Matrixpolysacchariden, beispielsweise vernetzte Hemicellulosen und pektische Polysaccharide, sowie die Glycosylierung von Strukturproteinen (z. B. Extensin, ADP-Glucose-Pyrophosphorylase) finden im Endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat statt. Synthetisierte Matrixpolysaccharide werden durch Exocytose in den Apoplast sekretiert. Dort bilden diese hochgeordnete Netzwerke mit Cellulosemikrofibrillen. Die Grundbausteine dieser Polysaccharide sind Pentosen (β -D-Xylose, α -/ β -L-Arabinose), Hexosen (β -D-Glucose, β -D-Mannose, α -D-Galactose), Hexuronsäuren (β -D-Glucuronsäure, β -D-4-Methylglucuronsäure, α -D-Galacturonsäure) und Deoxy-Hexosen wie α -L-Rhamnose und α -L-Fucose. Kohlenhydratderivate wie Polyhydroxycarbonsäuren können nativ bei der Oxidation von Hydroxylgruppen einfacher Zucker entstehen. Es bilden sich ein- oder zweiseitig an den Enden der Kohlenstoffketten Carboxylgruppen unter Entstehung von Aldonsäuren, Uronsäuren oder Aldarsäuren. Hemicellulosen, sogenannte Matrix-Polysaccharide, werden in vier verschiedene Klassen strukturell differierender Zellwand-Polysaccharidtypen eingeteilt: Xylane, Mannane, β -Glucane und Xyloglucane. Nach Cellulose stellen diese den zweithäufigsten nachwachsenden Rohstoff dar. Matrix-Polysaccharide variieren in ihrer Struktur vor allem hinsichtlich der Seitenkettenart, der Verteilung, der Lokalisation und des Typs sowie der Verteilung der glycosidischen Bindungen im makromolekularen Grundgerüst.

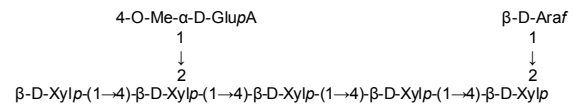
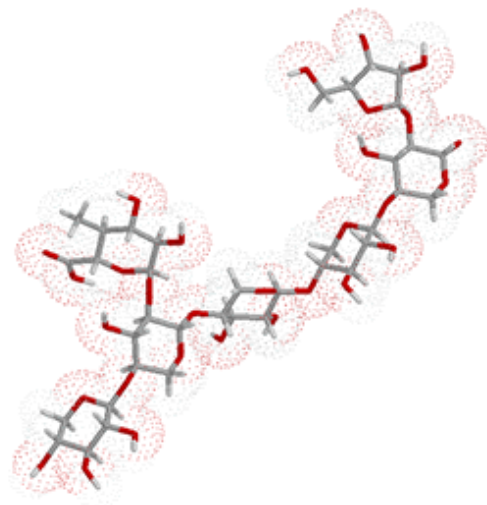
Xylane sind die Hauptbestandteile von Hemicellulosen der sekundären Zellwand und machen rund 20-30 % der Biomasse von Dikotyledonen aus. In Geweben von Monokotyledonen, speziell Gräser und Getreide, kann der Anteil an Xylan bis zu 50 % betragen. Es sind Heteropolymere, welche über ein β -1,4-D-Xylopyranose-Grundgerüst verfügen und zu 50-75 % durch α -1,2-gebundene Xylosylreste substituiert sind (Abb. 2-2, Abb. 2-3). In vielen Pflanzenspezies sind Xylosylreste an spezifischen Positionen weiter substituiert durch β -1,2-gebundene Galactosylreste, welche wiederum durch α -1,2-gebundene Fucosylreste substituiert sein können. Xylane enthalten D-Glucuronsäure oder deren 4-O-Methylether, L-Arabinose und/oder verschiedenartige Oligosaccharide, bestehend aus D-Xylose, L-Arabinose, D- oder L-Galactose und D-Glucose. Grundsätzlich können Xylan-artige Polysaccharide in zwei verschiedene Arten ein-

geteilt werden: Homo- und Heteroxylane, welche Glucuronoxylane, Arabinoglucuronoxylane, Glucuronoarabinoxylane, Arabinoxylane und komplexe Heteroxylane einschließen.



β-D-Xylp = β-D-Xylopyranose, Ac = O-Acetylgruppe, 4-O-Me- α -D-GlupA = 4-O-Methyl- α -D-Glucuronsäure

Abb. 2-2: Xylanstruktur von Angiospermen [nach Huber]



β-D-Xylp = β-D-Xylopyranose, 4-O-Me- α -D-GlupA = 4-O-Methyl- α -D-Glucuronsäure, β-D-Araf = β-D-Arabinofuranose

Abb. 2-3: Xylanstruktur von Gymnospermen [nach Huber]

Mannane können in zwei Gruppen unterteilt werden: Galactomannan und Glucomannan. Lineare Ketten aus β-1,4-verknüpften D-Mannopyranoseresten sind das Grundgerüst des Galactomannans, wohingegen Glucomannan β-1,4-verknüpfte D-Mannopyranosereste und β-1,4-gebundene D-Glucopyranosereste in der Hauptkette aufweist. Einzelne Seitenketten aus D-Galactopyranoseresten sind bei beiden Typen mit dem Mannan-Grundgerüst verbunden. Xyloglucane (XG) sind in allen höheren Pflanzen vorkommende Polymere und stellen quantitativ eine Hauptkomponente der primären Zellwand dar. In den Primärzellwänden der Dikotyledonen nehmen XGs rund 20-25 % ein, in Gräsern lediglich 2-5 % (Monokotyledone). XGs weisen cellulosische Grundgerüste mit α -D-Xylopyranoseresten in Position 6 auf. 1,3- oder 1,4-verknüpfte β-D-Glucane sind Hemicellulose-Bestandteile von Getreidekörnern. Hafer und Gerste enthalten beispielsweise rund 3-5 % β-Glucan. Diese wurden ebenfalls in nicht-endospermen Geweben von Monokotyledonen nachgewiesen. In Getreide vorkommende nicht verzweigte β-Glucane enthalten 70 % 1,4-gebundene und 30 % 1,3-gebundene D-Glucopyranosereste. Zudem sind L-Arabetano-D-Galactane in der Pflanzenwelt weit verbreitete Polysaccharide und können zwei verschiedene Strukturformen annehmen. Typ I wird hauptsächlich in Pektin von Früchten und Kartoffeln detektiert und enthält ein lineares Grundgerüst aus 1,4-β-D-Galactopyranose mit 1,5-gebundenen Seitenketten aus α -L-Arabinofuranose in Position 3. In Zellwänden von

Getreiden und Dikotyledonen besteht der Typ II (Arabino-3,6-Galactan) aus einem 1,3- β -D-Galactopyranose-Grundgerüst, welches in Position 6 durch Seitenketten aus Mono- und Oligosacchariden, bestehend aus Arabinosyl- und Galactosyl-Einheiten, substituiert ist. Das Polysaccharid ist z. B. im Lumen der Tracheiden lokalisiert und kann daher theoretisch nicht als Zellwand-Komponente klassifiziert werden, wird aber dennoch als Bestandteil der Hemicellulose angesehen. [Gruber, 2007; Ebringerova *et al.*, 2005; Scheible & Pauly, 2004; Ebringerova & Heinze, 2000]

Die aufgezeigten Verzweigungen der Moleküle der Hemicellulosen führen zu einem amorphen Material. Weiche, zähe, relativ hydrophile und in Alkalien lösliche Hemicellulosen wirken als flexible Kittsubstanzen für starre Elemente in Pflanzen und beeinflussen die Hydrophilie, die Zugänglichkeit und Abbaubarkeit von Stützgeweben. [Gruber, 2007] Als Quellstoffe steuern diese die Durchlässigkeit der Zellmembran [Hunziker, 2001]. Im Mais (*Zea mays*) wurden hauptsächlich Glucurono(arabino)xylane in reifen Blättern und komplexe Heteroxylane nachgewiesen. Insbesondere werden Arabinosen und Xylosen detektiert. [Ebringerova, 2000] Xylane von Maisfasern setzen sich prozentual aus 48-54 % Xylose, 33-35 % Arabinose, 5-11 % Galactose und 3-6 % Glucuronsäure zusammen. 80 % des Xylan-Grundgerüsts sind hoch substituiert durch monomere Seitenketten aus Arabinose oder Glucuronsäure oder durch oligomere Seitenketten, bestehend aus Arabinose, Xylose und partiell Galactoseresten. [Saha, 2003] Hemicellulosen von Roggen enthalten vorrangig Pentosane. Speziell der hohe Gehalt an Xylan in den Zellwänden stellt für praktische Applikationen eine immense Quelle an Biopolymeren dar. Hemicellulosen sind verwendbar für die Gewinnung verschiedenster Chemikalien wie Xylose und Furfural, nutzbar für die Herstellung von Treibstoffzusätzen, Aromastoffen, Kunststoffen und Desinfektionsmittel oder einsetzbar in Fermentationsprozessen wie der Biogas- und Bioethanolgewinnung. [Zhang, 2007; Howard *et al.*, 2003; Saha, 2003; Hunziker, 2001]

Das Kohlenhydrat-Polymer Pektin, welches mit Cellulosen und Hemicellulosen verknüpft ist, besteht aus neutralen und sauren Polymeren, dazu zählen Arabinane, Arabinogalactane Typ I und II, Pektinsäuren und Rhamnogalacturonane Typ I und II. Diese bestehen unter anderem primär aus Galacturonsäure, Glucuronsäure, Rhamnose, Galactose, Arabinose, Xylose und Fucose. Seltene, enthaltene Zucker sind beispielsweise Apiose, 2-O-Methylxylose und 2-O-Methylfucose und Acerinsäure. Hydroxylgruppen der C2- oder C3-Atome der Galacturonsäureeinheiten können acetyliert, und die Carboxylgruppen der Polygalacturonsäure mit Methanol verestert, vorliegen. Der Grad an Acetylierung und Veresterung wird durch die Herkunft des Pektins bestimmt und beeinflusst im Wesentlichen die chemischen Eigenschaften, daher werden Pektine aufgrund ihres Veresterungsgrades (VE) in hochveresterte Pektine mit

einem VE von über 50 %, niederveresterte Pektine mit einem VE von 5-50 % und Pektinsäuren mit einem VE von unter 5 % gegliedert. Pektinnetzwerke formen sich über kovalente und ionische Bindungen. [Ebringerova *et al.*, 2005; Cosgrove, 2005]

Lignin ist nach Cellulose und Hemicellulose in der Natur eine der häufigsten organischen Verbindungen. Lignin besteht aus sogenannten Phenylpropanoiden, auch Monolignole genannt. Deren Precursoren sind drei aromatische Alkohole: p-Cumarylalkohol, Coniferylalkohol und Sinapylalkohol, welche wie folgt eingeteilt werden: p-Hydroxyphenyl-, Guaiacyl- und Syringyl-einheit (Abb. 2-4). Diese werden im Cytoplasma, d. h. im Golgi-Apparat oder Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und als Monolignole oder Monolignolglucoside von Vesikeln in die Zellwand abgesondert.

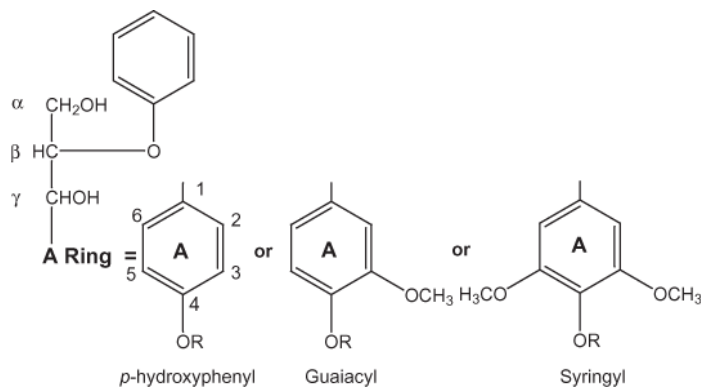


Abb. 2-4: Monomereinheiten des Lignins und deren häufigste Vernetzungsform, Vernetzung über β-O-4-Etherbindungen [nach Wershaw, 2004]

In Pflanzen enthaltene Enzyme wie Peroxidasen und Oxidasen bewirken eine Dehydrierung der phenolischen Hydroxygruppen und generieren bezüglich der Ligninprecursoren Zwischenprodukte mit freien Radikalen. Diese Radikale besitzen eine Vielzahl an Resonanzstrukturen. Eine Polymerisierung der drei Lignin-Precursoren erfolgt anfänglich durch eine Dimerisierung der verschiedenen freien Radi-

kalspezies unter Bildung von Lignanen. In Getreidearten dominierende Lignane sind: 7-Hydroxymatairesinol und Syringaresinol. Eine große Quelle an Lignanen wurde in Roggenkleie detektiert. Weiterhin reagieren die gebildeten Dimere mit den durch eine enzymatische Dehydrierung erzeugten Radikalen. Daraus resultierend entsteht in jeder Pflanzenspezies ein komplexes, amorphes, dreidimensionales und einzigartiges Ligninpolymer mit den Bindungstypen: β-O-4, α-O-4, β-5, β-1, 5-5, 4-O-5, α-β, β-6, 6-5, 1-O-4, 1-5, α/γ-O-γ und β-β. [Buranov & Mazza, 2008; Sticklen, 2008; Donaldson, 2001; Amen-Chen *et al.*, 2001] Lignine werden in drei Gruppen eingeteilt: a) Lignine von Nadelhölzern, b) Lignine von Laubhölzern und c) Lignine von Gräsern. Die Chemie des Lignins im Holz ist umfangreich untersucht worden. Gegensätzlich dazu sind Studien zu Ligninen in Gräsern begrenzt. In nicht holzartigen Pflanzen können Lignine in der γ-Position der Syringyleinheit acyliert vorliegen, z. B. acetyliert oder p-cumaroyliert. 20 % des Lignins in Mais ist p-cumaroyliert. Veresterte p-Cumarate machen 3-5 % des Gewichtes an Lignin in Gräsern aus. Ebenso ist Ferulasäure, in geringerem Maße Bestandteil von Lignin,

durch Ester- oder Etherbindungen verknüpft. Dies deutet auf inter- und/oder intramolekulare Ester-Ether-Brücken zwischen Ligninfragmenten hin. [Buranov & Mazza, 2008] Phenolsäuren wie Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren und Aldehyde wie p-Cumarsäure, Ferulasäure, p-Hydroxybenzoesäure, Vanillinsäure, Syringasäure, Sinapinsäure, p-Hydroxybenzaldehyd, Vanillin und Acetovanillon (verestert mit Ligninseitenketten) wurden unter anderem in alkalischen Extrakten von Roggenstroh und Maisstrünken detektiert. [Sun, 2002] Dibenzodioxocine mit trimerer zyklischer Ether-Lignin-Struktur und trimere Arylisochromane aus radikalischen Monolignolen sind in allen Ligningruppen detektierbar. [Buranov & Mazza, 2008]

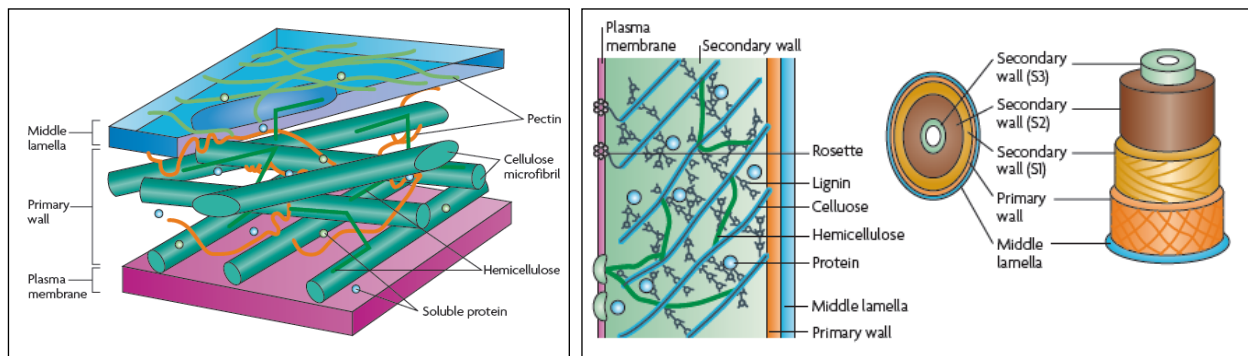
Lignin ist durch Aldehyd-, Alkohol-, Methoxyl- und Phenolgruppen funktionalisiert. Diese sind im vernetzten Makromolekül für Reagenzien schwer erreichbar. Am häufigsten lassen sich Methoxylgruppen detektieren. [Gruber, 2007] Eine Lignifizierung von Zellwänden ist vor allem abhängig von der Art und Vielfalt der in den Zellwänden lokalisierten Enzyme (Peroxidasen, Oxidasen), deren exakte Lokalisierung innerhalb der Zellwand sowie deren Verteilungsänderung während des Lignifizierungsprozesses. Der Lignifizierungsprozess wird weiterhin durch beteiligte Proteine und Kohlenhydrate der Matrix beeinflusst.

Wenig ist bekannt über die Verteilung und Natur der Zellwandproteine. [Donaldson, 2001] Beschrieben wurden Extensin-artige Proteine, Prolin-reiche Proteine und nicht enzymatisch gebildete Proteine. [Müsel *et al.*, 1997; Davin *et al.*, 1997; Bao *et al.*, 1992] Saisonale und umweltbedingte Einflüsse spielen ebenso eine wesentliche Rolle bei der Lignifizierung, wobei Temperatureinflüsse und Lichteinflüsse im Vordergrund stehen. [Donaldson, 1991; Grand *et al.*, 1979] Lignin wirkt in der Pflanze als Kittmaterial für den Zellverbund (Mittellamelle), als druckfeste Komponente in verholztem Gewebe, als Schutz gegen das Eindringen von Wasser ins Zellwandmaterial sowie als Schutz gegen UV-Licht, mechanische Beschädigungen und Schädlinge. [Gruber, 2007] Die Hauptwege der industriellen Ligninnutzung sind: die Verbrennung (Heizwert 23,4 MJ/kg), die Verwendung als polymerer Hilfsstoff (Klebstoffkomponente, Emulgiermittel *etc.*) und die Chemikaliengewinnung (Vanillin, Phenole, Teer, Benzol). [Gruber, 2005b]

2.1.2 Lignocellulosekomplexe in Energiepflanzen

Die Struktur, Konfiguration und Komposition der Zellwände variiert in Abhängigkeit von der Pflanzentaxonomie, vom Gewebe, Alter und Zelltyp. Zellwände bestehen aus Mittellamelle, Primär- und Sekundärwand und ggf. noch aus Tertiärwand. In der Mittellamelle sind hauptsächlich Pektine angereichert. Die Basisstruktur der Primärzellwand ist ein Gerüst aus Cellulose mit vernetzten Glucanen. Neben Cellulosen und Hemicellulosen weisen Primärzellwände von

Getreiden und anderen Gräsern geringe Anteile an Pektin und Proteinen auf. Die pflanzliche sekundäre Zellwand beinhaltet Cellulose, Hemicellulose, Pektin und Lignin. Die Zusammensetzung der primären und sekundären Zellwände ist in Abb. 2-5 grafisch dargestellt. [Achyuthan *et al.*, 2010; Sticklen, 2008; Gruber, 2007; Asp, 1987] Cellulosen sind gegensätzlich zur Hemicellulose in geringerem Maße in Primärwänden als in Sekundärwänden vorkommend. Pektine kommen überwiegend in der Mittellamelle vor. Die Verteilung und die Gehalte an Kohlenhydrat-Polymeren in den Zellwänden sind stark von der Pflanzenart abhängig. [Meak, 2002] Während des Reifeprozesses von Pflanzen verschiebt sich das Verhältnis von Zellinhalt und Zellwandbestandteilen im Zusammenhang mit der Faserzusammensetzung. Mit zunehmender Reife von Futterpflanzen steigen die Gehalte an Cellulose, Hemicellulose und Lignin in der Zellwand unter gleichzeitiger Abnahme der Zellinhaltsstoffe wie Proteine, Lipide und Mineralstoffe. [Beever, 2000]



Zellwände bestehen hauptsächlich aus Cellulosefibrillen, Hemicellulose, Pektin, Lignin und löslichen Proteinen; Cellulose synthetisierende Enzyme sind in der Form von Rosettenkomplexen vorzufinden, welche sich in der Plasmamembran befinden; Lignifizierungen erfolgen in den einzelnen Schichten (S1, S2, S3) der sekundären Zellwand; links: Primäre Zellwand; rechts: Sekundäre Zellwand

Abb. 2-5: Pflanzliche Plasmamembran und Zellwandstruktur [nach Sticklen, 2008]

Lignifizierungen werden mechanisch oder chemisch durch die Kohlenhydratmatrix, in der diese stattfinden, beeinflusst. Auch die Eigenschaften des Ligninpolymers werden durch die chemische Natur des Kohlenhydratmilieus kontrolliert. [Donaldson, 1991] Zwischen Cellulosen (hydrophil) und Hemicellulosen (amphiphil) sorgen Wasserstoffbrücken, leicht zu öffnende und reformierbare Bindungen [Salmen & Burgert, 2009], für eine stabile, aber flexible, Bindung. Die aromatischen Komponenten des Lignins (hydrophob) sind mit der Cellulose und der Hemicellulose u. a. über Ester- und Etherbindungen kovalent verknüpft. Auch Wasserstoffbrückenbindungen wurden zwischen Ligninen und Polysacchariden nachgewiesen. Lignin-Kohlenhydrat-Komplexe der Hölzer enthalten rund 85 % Lignin, 15 % Kohlenhydrate und 3 % Acetylgruppen. Die Komplexe von krautigen Pflanzen, unterscheiden sich strukturell von denen des Holzes und enthalten Ferulasäurebrücken zwischen Lignin und den Kohlenhydraten (Abb. 2-6).

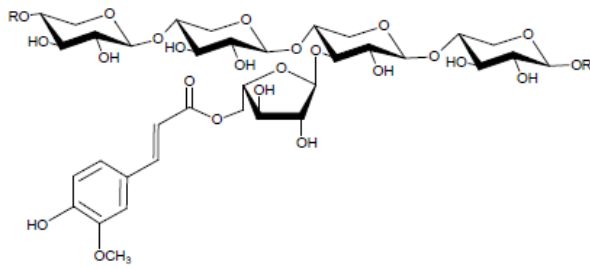


Abb. 2-6: Bindung von Ferulasäure an die L-Arabinoseseitenkette eines Heteroxylans (R = Xylose) [nach Hatfield *et al.*, 1999]

dungen verknüpfte Ferulasäuren und Polysaccharide bzw. Arabinoxylane werden als Ferulate bezeichnet (Abb. 2-6). Ferulatkupplungen an Monomere des Lignins sind Grundlage der Vernetzung von Ligninen mit Polysacchariden. Zellwandgebundene Phenolcarbonsäuren können über zwei verschiedene Mechanismen, die photochemische oder radikalische Kopplung, dimerisieren. [Dobberstein, 2009; Buranov & Mazza, 2008; Lawoko *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2005; Sun, 2002; Faulon *et al.*, 1994; Barton, 1988] Bekannt sind ebenso Triferulasäuren [Rouau, 2003].

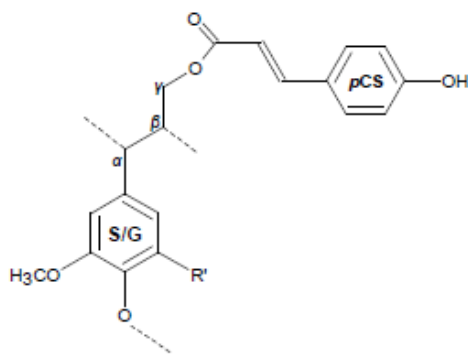


Abb. 2-7: Esterbindung von para-Cumarsäure (pCS) an die Syringyl (S)- oder Guaiacyl (G)-einheit des Lignins (R' = H (G), OCH₃ (S)) [nach Dobberstein, 2009]

Ferulasäure an Zellwandpolysaccharide und von p-Cumarsäure an Lignin nachgewiesen. Aufgrund der Fähigkeit der genannten Phenolcarbonsäuren Vernetzungen zwischen Makromolekülen der Zellwand auszubilden, scheinen diese die Zellwandstruktur und folglich die physiko-chemischen Eigenschaften der Zellwände zu beeinflussen. Neben Vernetzungen zwischen Polysacchariden oder Polysacchariden und Lignin durch Phenolcarbonsäuren konnte auch eine Kopplung von Polysacchariden und Proteinen über Ferulasäure-Tyrosin-Vernetzungen nachgewiesen werden [Piber & Köhler, 2005]. Eine Bindung von Ligninen mit pektischen Poly-

Ferulasäure ist durch Etherbindungen und Esterbindungen an Lignin bzw. Kohlenhydrate gebunden, und entsteht neben weiteren zellwandgebundenen Phenolcarbonsäuren wie p-Cumarsäure und Sinapinsäure durch den Phenylpropanstoffwechsel. Als Ausgangssubstanz dient das über den Shikimisäureweg bereitgestellte Phenylalanin. Durch alkali-labile Esterbin-

Bunzel *et al.* gelang 2006 die Isolierung und Identifizierung verschiedener Tetraferulasäuren. Neben Ferulasäuren gehören p-Cumarsäuren zu den Hydroxyzimtsäuren, welche mit Ligninkomponenten durch Ester- oder Etherbindungen und mit Polysacchariden durch Esterbindungen kovalent verknüpft sind (Abb. 2-7). Ferulasäuren sind vorrangig verethert mit Lignin, während p-Cumarsäuren verestert sind. [Xu, 2005] Ferulasäure und p-Cumarsäure wurden in der Arbeit von Dobberstein [2009] als dominierende Phenolcarbonsäuren in Maisrestpflanzen identifiziert und eine bevorzugte Bindung von

sacchariden wie Arabinose und Galaktose durch Feruloylgruppen wurde von Minor [1991] aufgezeigt.

Es fehlen *bis dato* unter Anderem Informationen bezüglich der mechanischen Funktionsweisen sowie der Wechselwirkungen einzelner Komponenten miteinander. Diesbezüglich ist die Beeinflussung mechanischer Eigenschaften durch verschiedene Anteile an Hemicellulosen, die mechanische Relevanz von kondensierten und nichtkondensierten Typen an Lignin in der gesamten Zellwand sowie die Wechselwirkung einzelner Zellwandkomponenten während des hochdynamischen Prozesses des Zellwandaufbaus oder die Bindung von Sinapinsäure an Polysaccharide zu nennen. [Salmen & Burgert, 2009; Dobberstein, 2009]

2.2 Abbau von Lignocellulosen

Lignifizierungen und die komplexe Beziehung zwischen Lignin und Polysacchariden oder Proteinen der Zellwand sind die Ursachen für eine verminderte Biodegradation von Maissilagen und anderer Futterpflanzen in verschiedenen Prozessen. Der präzise Mechanismus des reduzierten Abbaus durch eine Lignifizierung ist noch unklar. Lignine weisen, entsprechend ihrer variablen Struktur, der Art der Einlagerung in eine Polysaccharid-Matrix und der Arten der Verknüpfungen zu Hemicellulosen (C-C) oder Ferulasäurebrücken, unterschiedliche negative Effekte auf den Abbau von Polysacchariden durch Mikroorganismen auf. Freie Cellulose und Hemicellulose bzw. nichtlignifizierte Zellwände werden relativ schnell und extensiv durch verschiedenste Mikroorganismen bzw. Pilzenzyme abgebaut. Der Anteil, welcher im Lignocellulosekomplex gebunden ist, wird durch das einhüllende Lignin vor mikrobiellen Angriffen geschützt. [Carpita, 2008; Barriere *et al.*, 2005; Kämpfer & Weißenfels, 2001; Grabber *et al.*, 1997] Um photosynthetisch hoch effiziente C4-Pflanzen wie Mais als ergiebige und nachhaltige Quellen für Bioenergien zu nutzen, sind geeignete Aufschlussverfahren einzusetzen. Da bisher keine Einzelmechanismen zur kompletten Verzuckerung der Lignocellulose etabliert wurden, sind verschiedene Techniken zu kombinieren.

Der natürliche mikrobielle Abbauprozess der Lignocellulose ist eine Kettenreaktion, die durch eine Lignin-Peroxidase eingeleitet wird, welche reaktive Kationenradikale bildet. Der Ligninabbau ist meist ein cometabolischer Prozess, bei welchem Cellulose und Hemicellulose als Wachstumssubstrat bzw. Kohlenstoff- und Energiequelle dienen. Lignin wird aus dem Komplex gelöst, um Cellulosen und Hemicellulosen für den mikrobiellen Abbau verfügbar zu machen. Die Produkte des Ligninabbaus können sich partiell spontan oder enzymatisch katalysiert durch Polykondensation zu beispielsweise Fulvo- und Huminsäuren verbinden. [Kämpfer & Weißenfels, 2001] Im Biogasprozess können Lignocellulosen aufgrund der vorhandenen Biozö-

nose im Fermenter von Energiepflanzen nur bedingt abgebaut werden. Einzusetzende Vorbehandlungsstrategien sollen sich an natürlichen Abbauprozessen hinsichtlich der Lignocellulosen orientieren.

2.2.1 Hydrolyse und Oxidation von Lignocellulosen

Nicht-enzymatische Abbauprozesse unter Anwendung von chemischen, physikalisch-chemischen und physikalischen Methoden führen zur partiellen Hydrolyse und/oder Oxidation von Lignocellulosen und werden häufig zur Vorbehandlung von Lignocellulose gebraucht. Ziel ist die Freisetzung von Kohlenhydraten für industrielle Prozesse.

Thermische Hydrolysen von Lignocellulosen können durch die Nutzung des Dampfexplosionsverfahrens erzielt werden. Es entstehen eine Reihe an Hydrolyseprodukten wie Kohlenhydrate (Glucose, Xylose) und Aldehyde als Abbauprodukte von Monosacchariden (Furfural, 5-Hydroxymethylfurfural). Zerkleinerte Biomasse wird kurzzeitig mit Wasserdampf unter hohem Druck (0.69–4.83 MPa) und bei hohen Temperaturen (160–260 °C) behandelt. Ein schnelles Absenken des Druckes führt zu einer explosionsartigen Dekomprimierung des Materials. Daraus resultiert primär ein Abbau von Hemicellulose durch freigesetzte Säuren wie Essigsäure, eine Lignintransformation und folglich eine Verbesserung des Potenziales einer Hydrolyse von Cellulose zu Glucose. [Mosier *et al.*, 2005; Sun & Cheng, 2002] Pappelschnitzel konnten nach einer solchen physikalisch-chemischen Behandlung zu rund 90 % innerhalb von 24 h enzymatisch hydrolysiert werden. Ohne Vorbehandlung lag die Hydrolyserate bei 15 %. [Grous *et al.*, 1986] Eine Steigerung der Effizienz kann durch eine Zugabe von Schwefelsäure, Kohlendioxid oder Schwefeldioxid während des Dampfexplosionsverfahrens erreicht werden. Der Prozess setzt hohe Energiemengen voraus, welche jedoch gegenüber einer mechanischen Zerkleinerung geringer ausfallen. Einsparungen von bis zu 70 % an Energie sind möglich [Holtzaple *et al.*, 1989]. Nachteilig können eine unvollständige Zerstörung der Lignin-Kohlenhydratmatrix und inhibierende Effekte von Prozessprodukten wie Aldehyde auf Mikroorganismen sein. [Mackie *et al.*, 1985] An Stelle von Wasserdampf können in diesem Verfahren auch Ammoniak und Kohlendioxid eingesetzt werden. [Sun & Cheng, 2002] Behandlungen mit flüssigem Heißwasser stellen ebenso eine kosteneffektive Hydrolysebehandlung von Lignocellulose dar. Eine Wasserbehandlung benötigt Druck, um das Wasser in einem flüssigen Zustand bei erhöhten Temperaturen konstant zu halten. Die so genannte Hydrothermolyse (Solvolyse, Aquasolv) löst 40 bis 60 % der Biomasse, davon 4–22 % der Cellulose, 35–60 % des Lignins und nahezu die gesamte Hemicellulose, durch heißes verdichtetes flüssiges Wasser (15 Minuten, 200–230 °C). Die zu zersetzenden Biomassen müssen keiner Partikelgrößenreduktion unterzogen

werden, da die Partikel der Lignocellulose beim Kochen im Wasser zerlegt werden. Das Hydrolysat kann zu Ethanol fermentiert werden.

Grundlage von Säure- und Alkalihydrolysen der Lignocellulose ist die Anwendung von Schwefelsäure, Essigsäure oder Salzsäure bzw. Natriumhydroxid oder Ammoniak in unterschiedlicher Konzentration. Als besonders effektiv im Hinblick auf eine Hydrolyse von Cellulose zu Glucose und Hemicellulosen zu Xylose, Arabinose etc. erwies sich verdünnte Schwefelsäure in Durchflussprozessen ($>160\text{ }^{\circ}\text{C}$) für geringe Feststoffbeladungen und Batch-Prozesse für hohe Feststoffbeschickungen ($<160\text{ }^{\circ}\text{C}$). Es werden allgemein Etherbindungen zwischen Ferulasäuren und Lignin gespalten. Oxalsäure kann einen Großteil der Arabinose und der Ferulasäure von Maistrieben und Gerstenstroh lösen und Etherbindungen zwischen Arabinosen und Xylanen spalten. Es wurde von Wallace *et al.* [1995] nachgewiesen, dass eine vollständige Spaltung der Etherbindungen stattfindet. Der Mechanismus der alkalischen Hydrolyse schließt eine Esterspaltung unter Freisetzung von Ferulasäure der intermolekularen Esterbindungen ein, welche Hemicellulosen (Xylane) mit anderen Komponenten wie Lignine oder andere Hemicellulosen verknüpfen. Umso mehr Bindungen gespalten werden, umso poröser wird die Lignocellulose. Verdünnte Natronlaugen verursachen eine Quellung der Lignocellulose, was zum Anstieg des inneren Oberflächenbereiches, zur Abnahme des Polymerisierungsgrades, der Kristallinität, zur Separierung der strukturellen Bindungen zwischen Lignin und Kohlenhydraten und letztendlich zur Spaltung von Lignin führt. Die Hälfte der Phenolkomponenten in krautartigen Pflanzen können unter Anwendung von Natronlauge entfernt werden. Als problematisch erweisen sich Substanzen mit einem hohen Ligninanteil. Pektin kann bei alkalischen und sauren Abbauprozessen demethyliert werden.

Organosolvprozesse werden ebenso zur Spaltung von Lignin- und Hemicellulosebindungen genutzt. Es werden organische oder wässrige Lösungsmittel (Methanol, Ethanol, Aceton *etc.*) in Kombination mit anorganischen oder organischen Säurekatalysatoren (Schwefelsäure, Salzsäure, Oxalsäure, Salicylsäure) eingesetzt [Buranov & Mazza, 2008; Fraeye *et al.*, 2007; Mosier *et al.*, 2005; Lachenal *et al.*, 2004; Saha, 2003; Sun & Cheng, 2002; Fan *et al.*, 1987]

Lignine können durch oxidative Reaktionen aus der Polysaccharid-Matrix gelöst und Lignocellulosen sowie Lignin selbst fraktioniert werden. Nassverbrennungen sowie der Einsatz von Permanganaten, Monoethanolaminen, Peroxidasen in Kombination mit Wasserstoffperoxid und elektrochemische (α , α -Dicarbonyl-Oxime) oder photochemische Verfahren (UV/TiO₂-Prozess) wurden publiziert. [Burana-osot *et al.*, 2010; Kordsachia & Claus, 2005; Saha, 2003; Javor *et al.*, 2003; Sun & Cheng, 2002; Kim, 2001] Kombinationen aus Oxidationen und alkalischen Hydro-

lysen wurden aufgezeigt. Bjerre *et al.* [1996] wiesen diesbezüglich bei Weizenstroh eine 85 %ige Konversion von Cellulose zu Glucose nach. Durch die Charakterisierung der Abbauprodukte von Weizenstroh nach einer alkalischen Nassverbrennung durch Klinke *et al.* [2002] wurden als Hauptprodukte Kohlendioxid, Wasser und Carbonsäuren aus Hemicellulosen und Ligninen nachgewiesen.

Auch physikalische Behandlungen wie Pyrolysen oder chemische Verfahren wie Ozonolysen sowie der Einsatz von Glycerol, Dioxan, Phenol oder Ethylenglycol fördern insbesondere die Zerstörung der Cellulosestrukturen. Ferner werden Hydrazine, Dimethylsulfoxid, Calciumoxide oder Metallkomplexe wie Eisennatriumtartrat, Cadoxen und Cuoxan sowie ionische Flüssigkeiten zum Abbau von Lignocellulosen genutzt. Diese sind jedoch, auf die Praxis bezogen, sehr kostenintensive Verfahren, gemessen an der Kohlenhydratausbeute. [Mosier *et al.*, 2005; Saha, 2003; Sun & Cheng, 2002]

2.2.2 Abbau von Lignocellulosen mittels mikrobieller Enzyme

Die in Lignocellulose enthaltenen Biopolymere können durch eine Vielzahl an Mikroorganismen wie Bakterien, Schlauch- und Basidienpilze *etc.* abgebaut werden, im Besonderen von Fadenpilzen unter Anwendung von extracellulären Enzymen. Als Lignocellulose abbauende Organismen wurden beispielsweise *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Streptomyces sp.* und *Penicillium sp.* identifiziert und isoliert. Im Ökosystem spielen diese Mikroorganismen eine Schlüsselrolle bei der Regenerierung von Kohlenstoffen. Der Abbau von Zellwänden bzw. Lignocellulose ist ein komplexer Prozess, welcher das synergistische Wirken einer Vielzahl an extracellulären Enzymen voraussetzt. Sowohl in Bakterien als auch Pilzen werden hydrolytische oder oxidative Enzyme wie Cellulasen, Hemicellulasen, Pektinasen oder Ligninasen zur Energie- und Nährstoffgewinnung aus pflanzlichen Zellwandpolymeren genutzt. Eine Anwendung dieser Enzyme für die Hydrolyse von pflanzlicher Biomasse zur Freisetzung von Kohlenhydraten kann der Bereitstellung von Rohmaterialien für eine energetische oder stoffliche Verwertung dienen. Industriell hergestellte Stämme wie *Aspergilli* und *Trichoderma* sind in der Lage, hohe Gehalte an extracellulären Enzymen zu produzieren. [Sanchez, 2009; Aro *et al.*, 2005; Tengerdý & Szakacs, 2003; El-Gammal *et al.*, 1998; Durrant, 1996] *Bis dato* sind jedoch keine Organismen bekannt, welche in der Lage sind, alle nötigen Enzyme für eine Biokonversion in ausreichender Quantität zu erzeugen. [Kumar *et al.*, 2008]

Cellulose ist sowohl aerob als auch anaerob abbaubar. Ein Abbau wird bei cellulolytischen Mikroorganismen durch ein Spektrum an Enzymen ermöglicht. Am Abbauprozess sind drei

Arten von Enzymen beteiligt: Endoglucanasen, Cellobiohydrolasen und β -Glucosidasen. Das Enzym muss von der wässrigen Phase zur Oberfläche der Cellulose-Partikel gelangen, adsorbieren und Enzym-Substrat-Komplexe bilden. In der Hydrolase-katalysierten Hydrolyse von Polysacchariden sind generell zwei Carbonsäurereste involviert. In der Endoglucanase katalysierten Hydrolyse von Cellulose tritt der eine Rest mit dem glycosidischen Sauerstoffatom in Wechselwirkung, wobei der zweite Rest das C1-Kohlenstoffatom in einen säurebasierten Modus drängt, um eine Spaltung der glycosidischen Bindung zu ermöglichen. Es entsteht ein hoch reaktives Intermediat: glycosidisches Carboxylat. Durch das Angreifen eines Wassermoleküls am C1-Kohlenstoff bildet sich das Hydrolyseprodukt. Von den reduzierenden und nicht reduzierenden Enden der Hydrolyseprodukte können durch Cellobiohydrolasen (Exoglucanasen) Cellobioseeinheiten abgespalten werden. Dem folgend wird Cellobiose durch Cellobiasen (β -Glucosidasen) in der wässrigen Phase zu Glucose umgesetzt. Die für den Celluloseabbau verantwortlichen und bekannten Enzyme sowie die Stellen der Bindungsspaltung sind zusammenfassend in der Tab. 2-1 (S. 19) aufgeführt. Aerobe Mikroorganismen wie der Pilz *Trichoderma* oder die Bakterien *Streptomyces sp.*, *Xanthomonas sp.* und *Pseudomonas sp.* produzieren einzelne extrazelluläre Enzyme mit Bindungsmodulen für verschiedene Cellulosekonformationen. Diese spezifischen Enzyme agieren in Synergie zur effektiven Hydrolyse. Anaerobe Bakterien wie die Mehrheit der Klasse der Clostridia wie *Clostridium sp.*, *Ruminococcus sp.* und *Eubacterium cellulyticum* hingegen entwickelten Cellulosome, optimierte Multienzym-Komplexe. Bis zu 11 Enzyme sind mit dem nichtkatalytischen Proteingrundgerüst verbunden. Dadurch wird eine hohe lokale Konzentration und ein geeignetes Verhältnis zueinander und die entsprechende Anordnung und demzufolge ein ökonomischerer Weg der Hydrolyse garantiert. Cellulosome sind Zellausstülpungen, welche sich fest an kristalline Cellulose binden und dadurch Verluste an Hydrolyseprodukten durch Diffusionen minimieren. Außerhalb der Klasse der Clostridia konnten die Organismen *Thermobifida fusca* und *Fibrobacter succinogenes* als Produzenten von extrazellulären cellulosomalen Strukturen identifiziert werden. Hohe Cellulaseaktivitäten produzierende Pilze sind beispielsweise: *Sporotrichum pu.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Sclerotium r.* [Kim & Lee, 2009; Kobayashi & Ohmae, 2006; Schwarz, 2001; Walker & Wilson, 1991; Bisaria & Ghose, 1981] Schwarz [2001] geht davon aus, dass im Hinblick auf die einzelnen Enzyme des Celluloseabbaus, insbesondere die Endoglucanasen betreffend, weitere Differenzierungen existieren, welche *bis dato* nicht geklärt sind. Differenzen können vorrangig hinsichtlich der Bindungsaffinität zu Cellodextrinen, des Bedarfs an „unendlich“ langen Substratmolekülen, der Geschwindigkeit der Adsorption und Desorption, des

Gleitverhaltens entlang des Substrates, den Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen Enzymen oder der Größe des Produktes auftreten.

Die vollständige enzymatische Hydrolyse von Hemicellulose bedingt ebenso verschiedene miteinander agierende Enzyme. Zur Konversion sind zwei Gruppen von Enzymen vorausgesetzt. Die Enzyme der ersten Gruppe sind befähigt die Xylanhauptkette zu spalten: Xylanasen und β -Xylosidasen. Die zweite Gruppe setzt sich aus Enzymen zusammen, welche die Seitenketten und die Bindungen zwischen Xylan und anderen Pflanzenpolymeren spalten (Tab. 2-1, S. 19). Viele Xylanasen, welche die Xyloseketten des Grundgerüsts abbauen, sind nicht zur Spaltung von glycosidischen Bindungen zwischen Xyloseeinheiten, welche substituiert sind, befähigt. Die Seitenkette muss demnach vor der Hydrolyse des Xylan-Grundgerüsts abgespalten werden. Durch den enzymatischen Abbau entstehen in Abhängigkeit vom Hemicellulose Typ verschiedenartige Mono- und Oligosaccharide sowie Essigsäure. Xylanase produzierende Bakterien bzw. Pilze sind: *Bacillus sp.*, *Bacteroides sp.*, *Butyrivibrio sp.*, *Ruminococcus sp.*, *Clostridium sp.* bzw. *Aspergillus sp.*, *Myrothecium sp.*, *Coniphora sp.*, *Trichoderma re.*, *Chaetomium tr.* und *Penicillium jan.* [Wong, 2006; Aro *et al.*, 2005; Saha, 2003; Howard, 2003; Bisaria & Ghose, 1981] Viele Mikroorganismen wie *Penicillium capsulatum* oder *Talaromyces emersonii* besitzen ein vollständiges Xylan-abbauendes Enzymsystem. [Filho *et al.*, 1991]

Eine Pektinspaltung kommt *dito* nur durch ein Zusammenwirken mehrerer Enzymaktivitäten zustande. Man unterscheidet hinsichtlich des gelösten Pektins folgende Pektinase-Hauptaktivitäten: Pektinesterase, Polygalacturonase, Pektinlyase und Pektatlyase. Weitere Enzyme wie Pektin-glycosidase, Protopektinase und Mazerase dienen der Umwandlung von hochmolekularem, ungelöstem Pektin in lösliches Pektin. Zum vollständigen Abbau sind Enzyme wie Rhamnogalacturonan-Hydrolase, Rhamnogalacturonan-Lyase, Arabinase, Arabinofuranosidase, Endo-Xylogalacturonan-Hydrolase, ungesättigte Rhamnogalacturonyl-Hydrolase, Rhamnogalacturonan-Acetylerase, β -Galactosidase, Galactan-1,3- β -Galactosidase, Ferulasäureesterase und β -1,4-Endogalactanase notwendig. [Martens-Uzunova & Schaap, 2009; Haßelbeck & Stocke]

Holzzersetzende Pilze wie Basidiomyceten, Ascomyceten und Deuteromyceten, unterteilt in Weiß-, Braun- und Moderfäulepilze, sind in der Lage, Lignocellulose effizient zu depolymerisieren und modifizieren. Dazu zählen Organismen wie *Trametes sp.*, *Pleurotus sp.*, *Poria sp.*, *Lenzites sp.*, *Polyporus sp.*, *Phanerochaete sp.*, *Sporotrichum sp.*, *Lentinus sp.* und *Ganoderma sp.* Weißfäulepilze sind gegenüber Braunfäulepilzen befähigt, neben den Polysacchariden der Zellwand auch verstärkt Lignine in der Mittellamelle und der Sekundärwand abzubauen. Es wird unterschieden in simultane und selektive Weißfäule. Simultane Weißfäule von

Pilzen meint einen gleichzeitigen Stoffabbau von Cellulose, Lignin und Hemicellulose bei der Holzzersetzung. Bei der selektiven Fäule beginnt der Stoffabbau bei Lignin und Hemicellulose, wohingegen der Celluloseabbau im finalen Stadium der Zersetzung einsetzt. Braunfäulepilze können ebenso Lignin partiell modifizieren, wodurch Polysaccharide degradiert werden. Auch Moderfäulepilze (*Allescheria*, *Preussia* etc.) bauen Lignine durch ein Erodieren der Sekundärzellwand ab, jedoch bevorzugt bei feuchten und wenig Lignin enthaltenden Materialien. Zu den ligninabbauenden Bakterienarten zählen unter Anderem: *Streptomyces sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Aeromonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Agrobacterium sp.* und *Xanthomonas sp.*

Oxidative Abbauprozesse, bezogen auf Lignin, bedingen die Anwesenheit folgender Enzyme: Heme-Oxidasen bzw. Peroxidasen (Lignin-Peroxidase, Manganese-Peroxidase) und Phenoloxidasen (Laccase). Erstere katalysieren eine Reihe von Wasserstoffperoxid-abhängigen, oxidativen Reaktionen, wohingegen Laccasen unter Reduzierung von molekularem Sauerstoff zu Wasser phenolische Komponenten oxidieren. Demnach erhöhen hohe Sauerstoffgehalte durch die Produktion von Wasserstoffperoxid und die folgende Induktion der ligninolytischen Aktivität den Grad des Ligninabbaus. Die genannten Enzyme sind in der Lage über Ein-Elektron-Transfer-Reaktionen aus aromatischen Molekülen Radikale zu erzeugen. Dies führt zu einer Destabilisierung des Ligninmoleküls und über Folgereaktionen zum Abbau von chemischen Bindungen und demnach zur Depolymerisierung von Lignin. So gewonnene niedermolekulare Fragmente der Lignindegradation gelangen z. B. in die Hyphen der Pilze oder werden von Mikroorganismen aufgenommen und in intracelluläre katabolische Wege eingebaut. Weitere am Ligninabbau involvierte und bekannte Enzyme und deren Reaktionen können der Tab. 2-1 entnommen werden. [Sanchez, 2009; Aro *et al.*, 2005; Martinez *et al.*, 2005; Bisaria & Ghose, 1981]

Enzymatische Biokonversionen von Lignocellulose werden von Parametern wie pH, Temperatur, Adsorptionsverhalten, Enzymspezifität, Substrat- und Enzymkonzentration, Wasseraktivität, Stickstoffgehalt, Phosphorgehalt, Gehalt an phenolischen Komponenten und Inhibitoren beeinflusst. [Kumar *et al.*, 2008]

Tab. 2-1: Enzyme zum Abbau von Lignocellulose und deren Reaktionen

Enzym	Reaktion
Celluloseabbau	
Endo-1,4-β-Glucanase	Endohydrolyse von 1,4-β-D-glykosidischen Bindungen
Exo-1,4-β-Glucanase	Hydrolyse von 1,4-β-D-glykosidischen Bindungen unter Freisetzung von Cellobiose vom reduzierenden Ende
Exo-1,4-β-Glucanase	Hydrolyse von 1,4-β-D-glykosidischen Bindungen unter Freisetzung von Cellobiose vom nicht reduzierenden Ende
1,4-β-D-Glucan-Glucohydrolase	Hydrolyse von 1,4-β-D-glykosidischen Bindungen unter Freisetzung von Glucose
β-Glucosidase	Hydrolyse von terminalen, nicht reduzierenden β-D-Glucoseresten (Cellobiose) unter Freisetzung von Glucose
Hemicelluloseabbau	
Endo-1,4-β-Xylanase	Endohydrolyse von 1,4-β-D-xylosidischen Bindungen in Xylanen
Exo-1,4-β-Xylanase	Hydrolyse von 1,4-β-Xylosebindungen unter Freisetzung von Xylobiose
β-D-Xylosidase	Hydrolyse von 1,4-D-Xylanen zum sukzessiven Abbau von D-Xyloseresten (Xylobiose/Xylooligosaccharide) unter Freisetzung von Xylose
α-L-Arabinofuranosidase	Hydrolyse (1,2-α-L / 1,3-α-L / 1,5-α-L) von terminalen, nicht reduzierenden α-L-Arabinofuranosidenresten von Arabinoxylan
Acetylxytan-Esterase	Essigsäureester + Wasser → Alkohol + Acetat
Ferulasäure-Esterase	Hydrolyse von Esterbindungen in Xylanen
Cumarsäure-Esterase	Hydrolyse von Esterbindungen in Xylanen
α-D-Glucuronidase	α-D-Glucuronoside + Wasser → Alkohol + α-D-Glucuronat, Freisetzung von Glucuronsäure aus Glucuronoxylanen
Endo-1,4-β-Mannanase	Hydrolyse von 1,4-β-D-mannosidischen Bindungen in Mannanen
β-Mannosidase	Hydrolyse von terminalen, nicht reduzierenden β-D-Mannoseresten
α-Fucosidase	α-Fucoside + Wasser → Alkohol + Fucose
α-D-Galactosidase	Hydrolyse von terminalen, nicht-reduzierenden α-D-Galactoseresten
β-D-Galactosidase	Hydrolyse von terminalen, nicht-reduzierenden β-D-Galactoseresten
Ligninabbau	
Lignin-Peroxidase (Ligninase)	Katalyse verschiedener Oxidationen in Alkyl-Seitenketten, C-C Spaltung in den Seitenketten des Lignins, Oxidation aromatischer Verbindungen, Oxidation von Benzylalkoholen zu Aldehyden
Mangan-Peroxidase	$2 \text{ Mn(II)} + 2 \text{ H}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{ Mn(III)} + 2 \text{ H}_2\text{O}$
Versatile-Peroxidase	$\text{Donor} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Oxidierter Donor} + 2 \text{ H}_2\text{O}$
Laccase	z. B.: Hydrochinon + Sauerstoff → Benzochinon + Wasser, Polymerisierung von Vanillinsäure, Depolymerisierung von 1-β-/4-β-O-Ligninmodellkomponenten, Einzelelektronen-Transfer bei Acetosyringon zu einem Phenoxy- Radikal
Protocatechusäureoxidase	Oxidation von Protocatechusäure unter Ringspaltung
Brenzcatechin-1,2-Dioxygenase	Oxidation von Brenzcatechin unter Ringspaltung
Superoxiddismutase	$2 \text{ O}_2^- + 2 \text{ H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$
Glyoxalatoxidase	Glyoxalat + Wasser + Sauerstoff → Oxalat + Wasserstoffperoxid
Glucose-1-Oxidase	D-Glucose + Sauerstoff → Gluconolacton + Wasserstoffperoxid
Glucose-2-Oxidase	D-Glucose + Sauerstoff → 2-Dehydroglucose + Wasserstoffperoxid
Arylalkoholoxidase	Aromatisch, primärer Alkohol + Sauerstoff → Aromatisches Aldehyd + Wasserstoffperoxid
Cellobioseoxidase	Cellobiose + Akzeptor → Cellobiose-1,5-Lacton + reduzierter Akzeptor, Akzeptor z. B.: 2,6-Dichlorindophenol

[modifiziert, nach Leonowicz *et al.*, 1999]

2.3 Silierbarkeit und Silagequalität von Energiepflanzen

2.3.1 Silagen - Herstellung, Qualitätsmerkmale

Zum Erhalt der Qualität des Ausgangsmaterials bzw. der Energiepflanzen für eine ganzjährige Beschickung des Biogasreaktors wird die Silierung eingesetzt. Silos werden nach der Ernte und Zerkleinerung der Pflanzen mit diesen unter Verdichtung zur Luftverdrängung beschickt und das Silo anschließend verschlossen. Der danach ablaufende anaerobe Prozess basiert auf einer biochemischen Umsetzung von wasserlöslichen Zuckern zu organischen Säuren (Abb. 2-8), hauptsächlich Milchsäure, durch Milchsäurebakterien der epiphytischen Mikroflora des Pflanzenmaterials. Daraus resultierend, sinkt der pH-Wert der Silage, wodurch diese gegen unerwünschte mikrobielle Stoffwechselvorgänge von aeroben und fakultativ aeroben Mikroorganismen geschützt wird und pflanzeigene Enzyme deaktiviert werden. Zu den Gärschädlingen zählen u. a. Hefen, Schimmelpilze und Bakterien wie Clostridien, Listerien und Coli-aerogene Gruppen [Filya, 2004]. Das biochemische Prinzip des Silierens ist die Schaffung anaerober Verhältnisse, das schnelle Senken des pH-Wertes und damit eine Förderung der Entwicklung fakultativ anaerober Milchsäurebakterien, welche im Ausgangsmaterial rund 2 % der Keimflora ausmachen. Aus einem Mol Glucose entstehen während der Milchsäuregärung unter einem Energieverlust von ca. 5 % zwei Mol an Milchsäure.

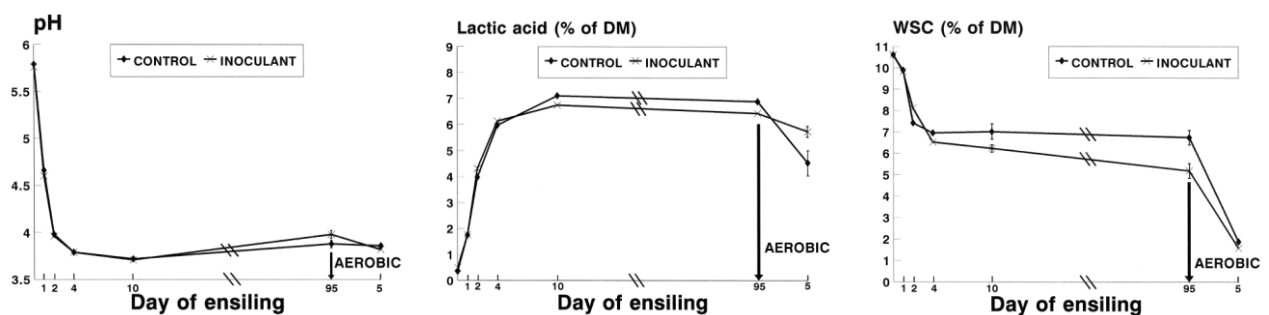


Abb. 2-8: Während der Silierung ablaufende Prozesse bezüglich des pH-Wertes (pH), der Milchsäure (Lactic acid) und der wasserlöslichen Kohlenhydrate (WSC) ohne (Control) und mit Zusatz von Milchsäurebakterien-zusatz (Inoculant) bei Mais; (DM = Trockensubstanz; Day of ensiling = Tag der Silierung) [nach Meeske & Basson, 1998]

Der Gärverlauf gliedert sich in a) die Aufschlussphase, auch Aerobe Phase, b) die Gärungsphase, auch Fermentationsphase, c) die Lagerphase, auch Stabile Phase sowie d) die Entnahmephase. In der ersten Phase wird der vorhandene Restsauerstoff veratmet. Mit der Kohlendioxidbildung sinkt der pH-Wert. Pflanzengewebe stirbt ab, die Zellintegrität geht verloren und es kommt zu einem Sacken des Siliergutes. Phase zwei dient der Vermehrung von Milchsäurebildnern, der Verdrängung unerwünschter Keime sowie Unterdrückung pflanzeigener Enzyme. Durch die ablaufenden Fermentationen entstehen zahlreiche Nebenprodukte wie Essig-, Propion- und

Buttersäure, Alkohole sowie Gase und Sickersaft. In der sich anschließenden Lagerphase bleibt der pH-Wert konstant und säuretolerante Enzyme liefern Zucker aus Speicher- und Gerüstgeweben nach. Bei der letzten Phase wird das Silo geöffnet. Sauerstoff kann eindringen und folglich die Vermehrung von Gärschädlingen begünstigen. Die Folge ist eine Erwärmung der Silage und Änderungen in der chemischen Zusammensetzung. Die während der Silierung auftretenden Verluste werden in Feldverluste, Sickersaftverluste und Verluste durch Restatmung und Fermentationen eingeteilt.

Milchsäurebildner können sich bei Temperaturen von 25 bis 40 °C und pH-Werten von 4 bis 5 am besten gegen andere Organismen unter anaeroben Bedingungen durchsetzen. Mäßige Feuchtigkeitsgehalte von 28 bis 40 % Trockensubstanz sowie ausreichende Mengen an vergärbaren Kohlenhydraten von > 2 % in der Frischmasse sind als optimal einzustufen.

Primär sind in Silagen Gattungen wie *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* und *Leuconostoc* nachzuweisen. Diese werden nach ihrem Kohlenhydratmetabolismus in obligate Homofermenter, fakultative Heterofermenter oder obligate Heterofermenter unterteilt. Homofermentative Bakterien nutzen hauptsächlich Hexosen (C₆-Zucker) als Edukt und können keine Pentosen vergären. Gegensätzlich dazu nutzen Heterofermentative sowohl Hexosen als auch Pentosen und bilden neben Milchsäure auch Essigsäure, Kohlendioxid und Ethanol. [Peyker, 2003; Oude Elferink *et al.*, 1999; Kamphues *et al.*, 1999] Zaunmüller *et al.* [2006] geben auch Erythritol, Glycerol und Mannitol als Produkte an.

Ziel eines optimalen Gärverlaufes in Silagen ist, den aus Pflanzenzellen stammenden Zucker von Milchsäurebakterien möglichst verlustfrei zu Milchsäure vergären zu lassen. Heute stellen neben dem Nährstoffgehalt und der Verdaulichkeit für Nutztiere vor allem die Fermentationsprodukte eine maßgebliche Basis zur Qualitätsbeurteilung der Silagen dar. Dazu wurde von der Deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft e.V. (DLG) ein DLG-Schlüssel zur Beurteilung der Gärqualität von Grünfuttersilagen wie Mais- und Getreideganzpflanzen auf der Basis chemischer Untersuchungen erstellt. Einbezogen werden die Gehalte an Essigsäure und Buttersäure sowie der pH-Wert. Das als Gärqualität bezeichnete Urteil liefert wichtige Hinweise auf das Ausmaß der entstandenen Nährstoffverluste, eingetretene Abnahmen des Nährstoff- und Energiegehaltes und die Lagerstabilität der Silage. [DLG, 2006] Ergänzend dazu wurde ein DLG-Sinnenschlüssel zur Beurteilung von Silagen, Grünfutter und Heu erstellt. Basis ist die sensorische Prüfung des Geruches, der Farbe, des Gefüges von Silagen und der Schmutzgehalt. [Nussbaum] Auch eine Analyse verderbanzeigender Keime scheint für eine mikrobielle Qualitätsbeurteilung geeignet. [Adler, 2002]

2.3.2 Auf die Produkte und Prozessstabilität Einfluss nehmende Milieubedingungen und Silierzusätze

Die Silierbarkeit von Pflanzen wird durch chemische (Pufferkapazität, Trockensubstanz, Nitratgehalt, Kohlenhydratgehalt), physikalische (Zerkleinerung vor der Silierung) und mikrobiologische (epiphytische Mikroflora) Eigenschaften bestimmt. So lassen sich die verschiedenen Pflanzen unterschiedlich gut silieren. Silomais vergärt in der Regel problemlos. Dies gilt auch für Roggen, wobei dieser aufgrund seiner Röhrenstruktur viel Sauerstoff einschließt und ins Silo einträgt. Daher muss auf eine gute Verdichtung und eine geeignete Partikelgröße von rund 6-10 mm geachtet werden. [Gries, 2008; Wyss, 2004; Nussbaum]

Beeinflusst wird die Silagequalität nach Kamphues *et al.* [1999] in erster Linie durch die Bodenverhältnisse, die Witterung, die Zerkleinerung der Pflanze, den Silotyp, die Zugabe von Siliermitteln, die Verdichtung, den Luftabschluss und durch die Entnahmetechnik und -frequenz. Durst [2008] zählt die Bestandsführung, den Schnitzeitpunkt, den Gehalt an Trockensubstanz, die Häcksellänge, die Siliermittel, die Verdichtung sowie die Abdeckung und das Management des Entnahmeprozesses (z. B. Energieverluste durch einen verzögerten Schnitzeitpunkt) zu den wichtigsten Faktoren. Im Folgenden wird auf ausgewählte Einflussfaktoren eingegangen.

In der Fachliteratur beschriebene Versuche mit Maissilage zeigen, dass Regenfälle während der Ernte und Einsilierung die Konzentrationen an Ammoniak, Ethanol und Essigsäure erhöhen. Temperaturen von 40 °C anstelle von 20 °C während der Silierung erhöhen den pH-Wert, die Verdaubarkeit, die Konzentration an Ammoniak, verbleibenden wasserlöslichen Kohlenhydraten und unlöslichem Rohprotein, einhergehend mit einer Reduktion der Konzentrationen an Faserstoffen sowie Milch- und Essigsäure. Die aerobe Stabilität wird durch hohe Temperaturen oder eine Wasserbenetzung erhöht, aber die Gesamtmengen an organischen Säuren gesenkt, welche für die Methanbildner im Biogasprozess leicht vergärbare Substrate darstellen. [Kim & Adesogan, 2006] Der Kohlenhydratgehalt (KHG), die Nahrungsgrundlage der Milchsäurebakterien, hat einen wesentlichen Einfluss auf die Fermentation. Dieser wird durch die Anzahl an Sonnenstunden und durch Regenfall während der Vegetationszeit sowie durch die Pflanzensorte, eine übermäßige Düngung (Abnahme des KHG) und das Reifestadium zum Schnitzeitpunkt beeinflusst. Zu den vorrangig vergärbaren Kohlenhydraten zählen Mono- und Oligosaccharide und Fructosane. Durch puffernde und basische Substanzen sinkt der pH-Wert aufgrund einer Neutralisation von durch Milchsäurebakterien gebildeten Säuren langsamer. Hohe Pufferkapazitäten bedingen daher hohe Milchsäuregehalte. Durch einen Kohlenhydrat/Pufferkapazitäts-Quotienten, das sogenannte biologische Säuerungspotenzial, kann die Vergärbarkeit eines

Pflanzenmaterials bestimmt werden. Nitrate können bis zur vollständigen Reduktion in Abhängigkeit von der Azidität der Silagen während der Silierung abgebaut werden. In der ersten Gärungsphase werden teils durch die epiphytische Mikroflora und pflanzeigene Enzyme über die Zwischenstufe Nitrit nitrose Gase gebildet, welche Buttersäurebildner hemmen können. Diesem positiven Effekt steht während Nachgärungen in späteren Gärungsstadien (Laktatabbau) die Freisetzung von Baseäquivalenten in Form von Ammoniak durch Clostridien oder Laktobakterien gegenüber. Aufgrund der Verknüpfung von Laktatabbau und Nitratreduktion hat die Anwesenheit von Nitrat im Gärsubstrat einen entscheidenden Einfluss auf die Art der Reaktionsprodukte des Laktatabbaus. Schmutzeinträge sollten vermieden werden, da ein Anstieg des Rohaschegehaltes um 1 % den Energiegehalt der Silage um 0,1 MJ NEL/kg Trockensubstanz (TS) senkt. [Gries, 2008; Weiß, 2001; Haigh, 1990] Zu grobe Strukturen, unzureichende Verdichtungen der Silos und mangelnder Luftabschluss durch Folien *etc.* führen zu aeroben Bedingungen. Die Folge ist eine Pflanzenatmung, eine Erwärmung und die Entwicklung einer aeroben Flora. Auswirkungen auf die Futtermittelqualität sind Saccharidverluste, Milchsäure- und Essigsäurekonversionen, die Bildung von alkalischen Produkten, Pilztoxinen, Alkoholen und Kohlendioxid. Folglich kommt es zu hohen Energieverlusten. Dies kann sich ebenfalls auf die Gasausbeute im Biogasprozess auswirken. Werden Silagen mit und ohne Schimmelpilzbefall vergoren, kann bei der Probe mit Schimmelpilzbefall eine deutliche Abnahme der Gasausbeute von bis zu 40 % nachgewiesen werden, ebenso ein Anstieg der unerwünschten Schaumbildung im Biogasreaktor. Unter anaeroben Bedingungen können durch zu hohe Wassergehalte Coli-Aerogene Essigsäure bilden. Liegen diese Bedingungen in Kombination mit zu hohen Temperaturen und pH-Werten vor, entsteht Buttersäure durch saccharolytische Clostridien. Buttersäuregärungen können Energieverluste von bis zu 40 % hervorrufen. Kommen zu hohe Keimgehalte im Ausgangsmaterial hinzu, werden Bedingungen für eine Eiweißzersetzung durch proteolytische Clostridien geschaffen. Es kommt folglich zur Bildung von Ammoniak und der pH-Wert steigt, wodurch sich Listerien vermehren können. Ein völliger Verderb durch Fäulnis ist das Resultat. [Durst, 2008; Thaysen, 2007; Weiß & Kaiser, 2004; Peyker, 2003; Kamphues *et al.*, 1999]

Sind alle Möglichkeiten, gute Gärqualitäten zu erzielen ausgereizt, dann sind Verbesserungen durch Siliermittelzusätze möglich. Siliermittelzusätze biologischer Natur wie Milchsäurebakterien und Enzyme oder chemischer Natur wie organische Säuren, Melasse, Harnstoff und Mineralien können einzeln oder in Kombination die Gärqualität, die Futteraufnahme, die Verdaulichkeit und die aerobe Stabilität von Silagen verbessern. [Richter & Mayerhuber, 2001; Oude Elferink *et al.*, 1999]

2.4 Methangasgewinnung

2.4.1 Biogasprozess - Verfahren, biochemische Abbauprozesse, Einflussfaktoren

Weltweit kommt der Gewinnung von Energie aus Biomasse eine große Bedeutung zu. Biomasse kann auf unterschiedliche Art und Weise aufgearbeitet und letztendlich in die gewünschte Energieform umgewandelt werden. Man unterscheidet nach eingesetzter Biomasse und gewünschtem Nutzenergeträger – Strom, Wärme, Treibstoff – [Herhaus, 2003]:

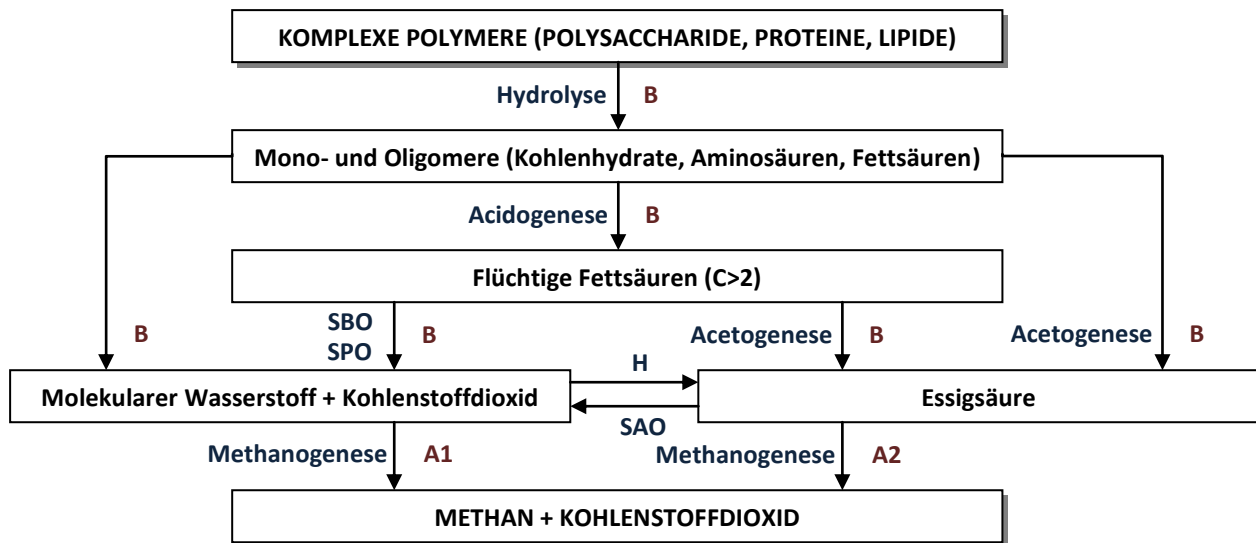
- Physikalische Verfahren: Extraktionsverfahren zur z. B. Ölgewinnung
- Thermochemische Verfahren: Verbrennung, Vergasung
- Biologische Verfahren:
 - anaerob: Biogas, Alkoholgewinnung, Klärgasgewinnung
 - aerob: Kompostierung

Verschiedene Verfahrensprinzipien stehen zur Umsetzung zahlreicher Substrate zur Verfügung. Biogasanlagen werden nach Stufigkeit und Phasigkeit gruppiert. Man unterscheidet zwischen ein- und mehrstufig bzw. –phasigen Anlagen. Realisierbar sind einstufig, einphasige Systeme bis hin zu mehrstufig, mehrphasigen Systemen. Bei mehrstufigen Anlagen werden die Hydrolyse und Methanbildung getrennt voneinander betrieben. Hinsichtlich der Prozesstemperatur differenziert man zwischen psychophiler ($< 25\text{ °C}$), mesophiler ($30\text{--}45\text{ °C}$) oder thermophiler ($> 50\text{ °C}$) Vergärung. Der pH-Wert sollte in einem Bereich zwischen 6,8 und 7,5 liegen. Konvertiert werden können im anaeroben Biogasprozess flüssige, pastöse und feste Substrate. Dazu zählen landwirtschaftliche Abfallstoffe, Rohstoffe wie Silomais und außerlandwirtschaftliche Abfallstoffe wie industrielle, gewerbliche und kommunale Abfälle. Silomais, eine C4-Pflanze, ist die Feldfrucht mit den höchsten Methanhektarerträgen. Aufgrund seiner guten Silierfähigkeit und einer hohen Wassereffizienz ist Mais besonders für die Biogasgewinnung geeignet. Die hohe Wassereffizienz meint, dass auch bei extrem hohen Temperaturen Zucker eingelagert und Biomasse aufgebaut werden kann. Zudem findet eine geringe Veratmung statt. Es erfolgt gegenwärtig auch eine verstärkte Züchtung spezieller Energiesorten. Die Eignung von Roggen, eine C3-Pflanze, als Ganzpflanzensilage (GPS) für Biogasanlagen ergibt sich auf vielen Standorten durch einen frühen Wachstumsbeginn, Anspruchslosigkeit (geringer Wasserbedarf, gute Ausnutzung der Winterfeuchte) und hohe Hektarerträge an Biomasse (hohe Wurzelleistung) sowie geringe Produktionskosten in der Biomasse- und Körnernutzung. Die GPS von Roggen ist durch einen relativ hohen organischen Trockenmasse-Ertrag pro Hektar sowie einen überdurchschnittlichen Fettgehalt als Biogassubstrat das am besten geeignete Getreide. Weiterhin zeichnet Roggen eine gute Frost- und Kälteresistenz und eine geringe Empfindlichkeit gegenüber der

Sommertrockenheit aus. Gezielte Energiefruchtfolgen durch die Kombination von C3- und C4-Pflanzen können die Ertragsleistung optimieren und für eine nachhaltige Landwirtschaft und Landschaftspflege sorgen. Die Produkte des Biogasprozesses sind Biogas bzw. Methan und organischer Dünger. Eine energetische Verwertung ist durch die Nutzung als Strom, Wärme, Kraftstoff und Wasserstoff möglich.

Vorteil des Biogasprozesses sind das Schaffen einer Kreislaufwirtschaft durch die energetische Verwertung biogener Reststoffe, eine Standortanpassung durch das Nutzen einer Vielzahl an Substratvarianten, eine Zunahme der Wirtschaftsfähigkeit des ländlichen Raumes und die Erzeugung thermischer sowie elektrischer Energie durch eine Kraft-Wärme-Kopplung. Als nachteilig können sich die Einsätze von Gärprodukten als Düngemittel, bezogen auf Stickstoff-Emissionen in Form von Ammoniak und auf den Humusgehalt des Bodens, auswirken. Ebenfalls können Schwefelablagerungen im Fermenter sowie ein Schimmelbefall bezüglich der verwendeten Silagen die Biogasproduktion negativ beeinflussen. [Weiland, 2006; FNR, 2006; Stölken, 2005; Zerr, 2005; Reinhold & Jahn; Schaumann BioEnergy GmbH; Roggenforum e.V.; Limagrain-Nickerson GmbH]

Biogas besteht im Wesentlichen aus dem energiereichen Methan (50-75 %), Kohlendioxid (25-45 %) sowie geringen Anteilen an Wasser (2-7 %), Schwefelwasserstoff (< 1 %) und Spurengasen (< 2 %). Das Methan im Biogas besitzt einen Heizwert von 9,97 kWh. Wird das Gasgemisch in einem Blockheizkraftwerk verstromt, entstehen bei einem elektrischen Wirkungsgrad von durchschnittlich 35 % 3,5 kWh Strom, welcher ins Stromnetz eingespeist werden kann. [FNR, 2008] Die Menge und Qualität des Biogases sind hauptsächlich von den Stoffgruppen Rohprotein, Kohlenhydrate und Rohfett bestimmt. Der anaerobe Abbau von organischer Biomasse zu Biogas ist ein komplexer mikrobieller Prozess (Abb. 2-9). Der Prozess besteht aus vier eng miteinander verknüpften Abbauschritten: Hydrolyse, Acidogenese, Acetogenese und Methanogenese. Es wird allgemein angenommen, dass bestimmte Gruppen von Mikroorganismen für bestimmte Stoffwechselreaktionen verantwortlich sind. Die Intermediate oder auch Endprodukte der Stoffwechselreaktionen stellen wiederum die Substrate für andere Mikroorganismen dar. Jede beteiligte Bakteriengruppe zweigt zur Biomassebildung während des Prozesses etwas von dem Kohlenstoff des Substrates in die bakterielle Biomasse ab. Als Biomassefaktor wurden 3,1 bis 10 % angegeben. Durch die Anpassungsfähigkeit des biologischen Systems können fast alle organischen Stoffe umgesetzt werden. Nicht umsetzbare Stoffe bilden das Gärprodukt: ligninhaltige Stoffe, einige Cellulosen und anorganische Bestandteile. [Zerr, 2005]



A1 = hydrogenotrophe Archaea (Coenzyme: Molybdopterin, Faktor F430 der Methyl-Coenzym-M-Reduktase)

A2 = acetoklastische Archaea (Coenzyme: Molybdopterin, Faktor F430 der Methyl-Coenzym-M-Reduktase)

B = verschiedene Arten an Bakterien

H = Homoacetogenese

SAO = Syntrophe Acetat-Oxidation

SBO = Syntrophe Butyrat-Oxidation

SPO = Syntrophe Propionat-Oxidation

Abb. 2-9: Intermediate bei der Methanbildung [modifiziert nach Ahring, 2003]

Die Methanbildung erfolgt durch methanogene Archaeen, welche meist hinsichtlich der metabolischen Energiegewinnung sehr spezialisiert sind. Diese Mikroorganismen weisen eine einzigartige Biochemie auf. *Methanobrevibacter sp.* können lediglich Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid für das Wachstum nutzen. *Methanosaeten sp.* können wiederum nur Acetat verwerten. *Methanosarcina sp.* sind in der Lage, Wasserstoff und Kohlendioxid, Acetate, Methanol, methylierte Amine und Pyruvat zum Wachstum und zur Methanbildung zu nutzen. Aufgrund dieser limitierten Anzahl von möglichen Wachstumssubstraten wird die anaerobe Zerlegung von organischer Materie durch eine Biozönose aus physiologisch unterschiedlichen Typen von Anaerobiern ausgeführt (Syntrophie). In zweiphasigen Biogasfermentationen mit nachwachsenden Rohstoffen konnten Klocke *et al.* [2009] verschiedene Vertreter der Methanomicrobiales, Methanobacteriales und Methanosarcinales sowie eine Reihe bislang taxonomisch nicht beschriebener Euryarchaeota nachweisen. Die Anteile der einzelnen Gruppen der Methanogene variieren zwischen den einzelnen Fermentationsansätzen und Prozesszuständen. Je nach Reaktorsystem variierte ebenso das Verhältnis von Essigsäure- oder Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid verwertenden Methanbildnern. Dies ist Indiz für unterschiedliche Stoffflüsse innerhalb des Biogasreaktors. Bei der quantitativen PCR-Verfolgung (PCR: Polymerase Kettenreaktion) der Ent-

wicklung der Mikrobiologie in einer zweiphasigen Fermentation von Maissilage herrschten zu Beginn der Fermentation die Acetat verwertenden Methanogene im Prozess vor, wonach sich die hydrogenotrophen Arten im Verlauf einer andauernden Vergärung durchsetzten. Arab & Helmreich [2008] wiesen dem hinzu, dass bei Mais und Gras ein thermophiler Prozess im Vergleich zum mesophilen zu optimalen Bedingungen für Methanogene führt. Die Bakteriengemeinschaft wies in der Hydrolyse pflanzlicher Biomasse eine sehr hohe Artenvielfalt auf. Es fanden sich die größten Biodiversitäten innerhalb des Stammes Firmicutes, und hier vorrangig in der Klasse Clostridia, sowie in dem Stamm Bacteroidetes. Es gibt jedoch weiterhin große Defizite im Hinblick auf die Struktur, Zusammensetzung und mikrobielle Aktivität der Biozönose und deren Abhängigkeit von der Art des Substrats und der Prozessführung. [Klocke, 2009; Arab & Helmreich, 2008; Scherer, 2006; Claassen *et al.*, 1999]

Die bei einer anaeroben Vergärung zur Säure- und Methanbildung genutzten Mikroorganismen differieren betreffend ihrer Physiologie, dem Nährstoffbedarf, der Wachstumskinetik und der Sensitivität gegenüber Umwelteinflüssen. Die primäre Ursache für eine Instabilität des Prozesses ist eine nicht aufrecht erhaltene Balance zwischen den Mikroorganismengruppen. Inhibierende Substanzen in beachtlichen Konzentrationen sind meist der maßgebliche Grund für eine Reaktorstörung. Eine Vielzahl an Substanzen sind als Hemmstoffe des anaeroben Vergärungsprozesses identifiziert worden:

- Ammoniak: intrazellulärer pH-Wechsel, Inhibierung spezifischer Enzymreaktionen, Verursachung eines Protonen-Ungleichgewichts und/oder eines Kaliummangels in Zellen
- Sulfide: Denaturierung von nativen Proteinen im Cytoplasma durch Bildung von Sulfid- oder Disulfidverknüpfungen zwischen Polypeptidketten
- Leichtmetallionen (Natrium, Kalium, Magnesium, Calcium, Aluminium): Dehydrierung von Zellen *etc.*
- Schwermetalle (z. B. Chrom, Eisen, Kobalt, Kupfer, Zink, Cadmium, Nickel, Wolfram, Molybdän): Beeinflussung der Enzymfunktionen und -strukturen durch Bindung an Thiole oder andere Gruppen der Proteine oder durch Verdrängen von natürlich vorkommenden Metallen in prosthetischen Gruppen von Enzymen
- Organische Stoffe wie Phenole, Chlorophenole, halogenierte Aliphate, N-substituierte Aromate, langkettige Fettsäuren (z. B. Ölsäure, Laurinsäure)

Letztere können in geringer Konzentration während der Vergärung abgebaut werden. Die genannten Metalle sind einerseits in bestimmter Konzentration für den Biogasprozess notwendig und andererseits in hoher Dosis hemmend. Inhibierungen werden generell durch einen Rückgang

der Methangasproduktion und als Akkumulation von organischen Säuren angezeigt. [Chen *et al.*, 2008; Hernandez & Edyvean, 2008; Baumann, 2007; Hanaki *et al.*, 1981]

Optimierte Gärprozesse sind Ziel und Notwendigkeit beim Betrieb von Biogasanlagen. Es wird eine höchstmögliche Effizienz und Wettbewerbsfähigkeit der Biogaserzeugung angestrebt. Dazu bestehen Möglichkeiten hinsichtlich der gesamten Erzeugungskette. Bis zum jetzigen Zeitpunkt publizierte Faktoren, welche den Biogasertrag von Energiepflanzen in Menge und Qualität und den entstehenden Dünger in Qualität und Wirtschaftlichkeit beeinflussen und demnach zur Effizienzsteigerung nutzbar sind, werden im Folgenden genannt:

- *Biomasse*: Standort (Boden, Wasserversorgung), Klima/Witterung, Sorte, Management (An-/Nachsaat, Düngung, Pflanzenschutz, Pflege, Wasserregulierung), Erntezeitpunkt, Zusammensetzung, Pflanzenteil, Zusätze (Siliermittel), Vorbehandlung (Enzymzusätze), Konservierung (Silierverfahren), Aufbereitung (Zerkleinerung)
- *Fermentation*: Technologie, Biodiversität, Zusätze, Nährstoffe, Umweltaspekte

Um die Effizienz von Biogasanlagen zu steigern und damit maximale Methanausbeuten zu erzielen, kann die Substratzusammensetzung und das Anlagenmanagement optimiert und die operativen wie Temperatur, Verweilzeit, Partikelgröße des Substrates *etc.* und technologischen Parameter wie Rührwerk, Biofilter *etc.* positiv beeinflusst werden. Bezugnehmend auf mögliche Hilfsstoffe wurden anfänglich chemische sowie biologische Additive zur Stimulation der mikrobiellen Aktivität zugesetzt. Dazu zählen „Grüne Biomassen“ wie pulverisierte Blätter verschiedener Pflanzen: *Leucacena leucocephala*, *Eucalyptus tereticornis*, mikrobielle Kulturen mit speziellen cellulolytischen Aktivitäten wie Actinomyceten oder Zelllysate oder anorganische Additive wie Schwermetalle: Kupfer, Zink, Chrom; Eisensalze; Harnstoff; Adsorbentien: Silica-Gel, Gelatine, Pektin, Kaolin, Aluminiumpulver, Bentonite; Calcium- und Magnesium-Salze. In den letzten Jahren kamen Prozesshilfsstoffe wie Kalk, Strohmehl, weitere Tonmineralien und Spurenelementpräparate, Algen, Eisen-(II)-hydroxid, Vitamine und Enzympräparate hinzu. [Hopfner-Sixt, 2007; Bäuml, 2006; Amon *et al.*, 2005b; Yadvika, 2004] Auf den Einsatz von Enzympräparaten wird in den folgenden Abschnitten eingegangen.

2.4.2 Inokulum - Aktivierung und Inhibierung der Methanbildung

Impfmaterialien zur Initiierung einer Biogasbildung werden generell in Impfgüllen und Impfschlämme unterteilt, wobei erstere Abprodukte der Viehhaltung (Gülle) oder Gärprodukte von Biogasanlagen (Biogasgülle) darstellen und zweitens die Faultürme einer Kläranlage entnommen werden. Inokula enthalten ein weitreichendes Spektrum an Mikroorganismen zum Abbau komplexer organischer Biomasse sowie zur Bildung des Energieträgers Methan. Die Ent-

stehung des Methans ist bei der anaeroben Vergärung von Biomasse u. a. von der Herkunft und vom Alter des Impfmateri als abhängig. Dieses enthält neben den für den biologischen Prozess erforderlichen Mikroorganismen zahlreiche organische und anorganische Verbindungen. Je nach Herkunft und biologischem Abbaugrad (Schlammalter) können die Biodiversität sowie die Zusammensetzung stark variieren. Inokula haben demzufolge einen Einfluss auf den zeitlichen Verlauf und bei nicht ausreichender Vielfalt des Organismenspektrums auf den insgesamt entstehenden Methanertrag. Wesentliche Unterschiede sind in der Kinetik der Vergärung nachzuweisen. Während die Biogasentwicklung von Faulschlamm nach einer schnellen Startphase in kurzer Zeit auf einem hohen Niveau zum Erliegen kommt, sind Impfmateri alen aus z. B. Biogasanlagen in der Lage, sich nach mehreren Adaptionsphasen an die besonderen Nährstoffverhältnisse des Substrates anzupassen und durch einen mehrstufigen Abbau der organischen Masse höhere Biogasvolumina zu erzielen. [Schläfer *et al.*, 2007; Beer & Suntheim, 2003] Inokula können wie Biogassubstrate Hemmstoffe enthalten. Eine Auswahl an Hemmstoffen ist in Abschnitt 2.4.1 aufgezeigt. Impfmateri alen werden in einem Überschuss dem Biogasprozess zugesetzt, wobei das Verhältnis von Faulschlamm zum Substrat entscheidend für eine Vergärung ist. Fischer [2002] publizierte einen Einfluss des Faulschlammanteils im Gäransatz auf das Biogasvolumen von kristalliner Cellulose. Weitere Publikationen zeigen einen deutlichen Einfluss des Inokulum/Substrat-Verhältnisses auf die Methanproduktion aus Cellulose, Schilfrohr, Gras und Mais. [Raposo *et al.*, 2006; Gunaseelan, 1997] Die VDI-Richtlinie schreibt zur Unterbindung von Prozesshemmungen durch zu hohe Probenmengen im Gäransatz ein Verhältnis der organischen Substanz von Substrat zum Impfschlamm von $\frac{oTS_{\text{Substrat}}}{oTS_{\text{Impfschlamm}}} \leq 0,5$ vor. [VDI, 2006]

2.4.3 Biopolymere als C-Quelle

Energiequellen resultieren in Pflanzen aus der Konversion von Lichtenergie zu chemischen Energien unter Synthese von Kohlenhydraten. Atmosphärische Kohlenstoffe werden in der Biomasse gelagert, daher ist lignocellulosische Biomasse die ergiebigste nachwachsende biologische Quelle auf der Erde. [Zhang, 2008] Der Energieträger Pflanze ist regenerativ, was bezüglich der Energiegewinnung eine beständige Energieversorgung sichert. Der Kreislauf des Kohlendioxides kann bei der Energiegewinnung aus Biomassen geschlossen werden, wodurch einer Verstärkung von Treibhauseffekten entgegengewirkt wird. Für die Nutzung als nachwachsender Rohstoff kommen in erster Linie höhere ausdauernde Pflanzen in Frage, da die Gerüst- (Stängel, Blätter, Wurzel) und Speichergewebe (Körner, Knollen, Früchte) der höheren Pflanzen die wichtigsten Quellen nutzbarer Biomasse sind. Saccharide aus den genannten Geweben stellen ein großes Potenzial für die Biomethanisierung und eine der wichtigsten Nährstoffgruppen in Futtermitteln

dar. Mais und Roggen enthalten in der Trockensubstanz rund 80 % Kohlenhydrate. Die in Gerüstgeweben enthaltenen Lignocellulosen enthalten typischerweise 55-75 % Kohlenhydrate in der Trockenmasse. [Mosier *et al.*, 2005; Gruber, 2005b]

Biomassen wie Cellulosen, Hemicellulosen und Lignine stellen ein Mittel zur Ansammlung und Lagerung solarer Energie dar, welche infolgedessen eine Energie- und Materialquelle repräsentieren. Um derartige Polymere und andere Ressourcen wie Lipide und Proteine nutzen zu können, müssen diese in eine verwertbare Form wie Methan überführt werden. [Bisaria & Ghose, 1981] Dazu bedient man sich zum Beispiel biologischer Methoden wie der Hydrolyse und Fermentation in Biogasprozessen (Abschnitt 2.4.1). Einer der wichtigsten Schritte, um solche Prozesse zu realisieren, ist die effiziente Konversion der Anteile an Biopolymeren. Wachse und die Oberhaut einer intakten Epidermis verhindern die Zugänglichkeit für Mikroorganismen [Malherbe & Chloete, 2002], daher muss als erster Schritt vor der Methanisierung eine Zerkleinerung der Pflanzenteile wie das Häckseln zum Zellaufschluss und zur Freisetzung vergärbare Kohlenhydrate erfolgen. Je stärker ein Substrat zerkleinert wird, umso größer ist dessen Oberfläche und somit die Angriffsfläche für den mikrobiellen Abbau. Dies gilt sowohl für die Silierung als auch für die spätere Biomethanisierung. Jedoch ist zu beachten, dass bei gleichzeitiger Verfütterung der Silagen an Wiederkäuer die Pflanzenstruktur größtenteils erhalten bleiben muss. [Thaysen, 2008]

Die wirtschaftliche Effizienz und Wettbewerbsfähigkeit einer anaeroben Vergärung hängt von den Investitionskosten, den Verfahrenskosten und der optimalen Methanproduktion ab. Eine maximale Methanausbeute ist besonders im Hinblick auf Energiepflanzen bedeutsam, da die Produktionskosten für Energiepflanzen durch die Methanproduktion gedeckt werden müssen. Maximale Methanerträge setzen eine ausreichende und effiziente Nährstoffzufuhr voraus. [Amon *et al.*, 2007a] Um Nährstoffe (C-Quellen) aus Lignocellulosen freizusetzen, sind neben mechanischen Aufbereitungsschritten in einem zweiten Schritt geeignete chemische und/oder biologische Vorbehandlungsstrategien erforderlich. Ziel der Vorbehandlung von Lignocellulosen ist eine Entfernung von Lignin und Hemicellulose, eine Reduktion der Cellulosekristallinität und eine Steigerung der Porosität des Materials. Eine entsprechende Vorbehandlung von Lignocellulose setzt Folgendes voraus:

- Hohe Zuckerausbeute, geringer Zuckerabbau, hohe enzymatische Celluloseabbaubarkeit
- Fraktionierung der Lignocellulose-Komponenten für eine bessere Ökonomie
- Reaktionskonditionen: geringe Temperaturen, geringe Bildungsrate an Inhibitoren, geringer Energieverbrauch

- Geringe Kapitalinvestitionen und Verfahrenskosten
- Erzeugung amorpher Cellulosen aus kristallinen Cellulosen für eine schnelle Hydrolyserate
- Breite Substrateinsatzbarkeit für eine Vielzahl an Einsatzprodukten

Derzeitig existiert eine Vielzahl von chemischen, physikochemischen, physikalischen und biologischen Prozessen zur Vorbehandlung von Lignocellulosen. [Zhang, 2008; Mosier *et al.*, 2005; Sun & Cheng, 2002] Da in anaeroben Prozessen wie dem Biogasprozess die Hydrolyse der limitierende Schritt ist, hängt die Biogasproduktion vorrangig von der Abbaubarkeit der Lignocellulose enthaltenen Biomasse und der Hydrolyserate ab. [Fernandes *et al.*, 2009] Daher wurden in dieser Arbeit enzymatische Vorbehandlungsstrategien mit einer Applikation von Hydrolasen und Oxidoreduktasen entwickelt. Durch eine Vorbehandlung von gehäckselten Energiepflanzen mit kommerziellen Enzymen zur Steigerung der Prozesseffizienz, kann eine Reduzierung von Anbauflächen für Energiepflanzen, eine Entlastung für den Anlagenbetreiber beim Substratzukauf sowie zusätzliche Fläche für den Landwirtschaftsbetrieb für den Nahrungsmittelanbau oder für Alternativkulturen zum Energiemais geschaffen werden. Weitere Vorteile des Enzymeinsatzes in Biogasprozessen können sein:

- Zunahme der Gasbildung
- Auflösung von Schwimmschichten, Verbesserung der Rührfähigkeit, Viskositätssenkung
- Reduzierung von Störstoffen
- Verringerung der Verweilzeit
- Verbesserung der Substratausnutzung, Steigerung der Zufütterung
- Keine neuen Investitionen
- Ganzjähriger Einsatz möglich
- Verbesserung der Prozessstabilität

Als nachteilig können sich die relativ hohen Präparatkosten, der Abbau der Enzyme durch Mikroorganismen, nicht optimale Milieubedingungen für die Enzyme sowie Inhibierungen durch Prozessintermediate erweisen.

Es sollte mit einer „Löcherung“ des Zellwandgerüsts durch einen enzymatischen Abbau des Mittellamellenpektins begonnen werden. Hang & Woodams [1999] publizierten die Freisetzung einer Vielzahl von reduzierenden löslichen Kohlenhydraten aus Maiskolben, Maishülsen und Getreideresten durch den Zusatz einer Pektinase. Alkalisch enzymatisch behandelte Extrakte wiesen z. B. nach einer 45-stündigen Behandlung bei pH 5,0 und 50 °C eine Steigerung der Ausbeute an löslichen Zuckern von 156 g/kg Trockenmasse (TS) auf 624 g/kg TS auf. Geringere Zuckerausbeuten wurden mittels Cellulasen und Xylanasen gemessen. Mit steigender Reaktions-

zeit nahm der Gehalt an reduzierenden Zuckern zu. Wohingegen mit einer Zunahme der Substratkonzentration die Ausbeute sank. [Hang & Woodams, 2001; Hang & Woodams, 1999; Yoon *et al.*, 2006] Weiterhin sind der Abbau von Lignin und/oder eine Ligninmodifikation die Grundvoraussetzung für eine Zersetzung von Lignocellulose bzw. eine Hydrolyse von Cellulose und Hemicellulose und dementsprechend für die Nutzung von Kohlenstoffquellen als Energiequelle, da das heterogene Lignin eine physikalische Barriere gegenüber Mikroorganismen darstellt. Unter anderem führt der Einsatz von kommerziell erhältlichen Laccasen oder Basidienpilzen zur partiellen Degradierung von Lignin. [Hendriks & Zeeman, 2009; Kim & Lee, 2006; Martinez *et al.*, 2005; Weiß, 2003; Howard, 2003] Kenealy *et al.* [2003] setzten Laccasen zur Oberflächenveränderung von Faserstoffen ein. Diese Enzyme besitzen ein geringes Redoxpotenzial und können daher phenolische Lignineinheiten unter Bildung von Wasser direkt oxidieren, wodurch es gleichzeitig zu einer Demethylierung und Bildung von Chinonen kommt, resultierend in einer Ringspaltung. Unter Anwesenheit eines Mediators können weiterhin nicht-phenolische Komponenten oxidiert werden. [Wong, 2009; Mayer & Staples, 2002] Weiß [2003] wies unter Anwendung von Basidienpilzen niedermolekulare Abbauprodukte wie Zimtsäure, 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure, Trihydroxyzimtsäure, 2,5-Furandicarbonsäure (Carbonsäuren = C-Quelle) nach. In Abhängigkeit vom jeweiligen Pilz und Substrat wurde von El-Gammal *et al.* [1998] eine signifikante Freisetzung von niedermolekularen Intermediaten und reduzierenden Zuckern aus Lignocellulosen identifiziert. Zur Freilegung der von Mikroorganismen abbaubaren Cellulose und zur Freisetzung verschiedener Kohlenhydrate ist eine Konversion von Hemicellulose durch Hemicellulasen erforderlich. Ebenso kann der Einsatz kommerziell erhältlicher Cellulasen die Hydrolyserate beschleunigen, da die kristallinen Bereiche der Cellulose sehr langsam abgebaut werden, verglichen mit der Hydrolyserate von amorpher Cellulose, und diese Hauptbestandteile der nativen Cellulosen sind. [Mansfield *et al.*, 1999]

3 Material und Methoden

3.1 Laborgeräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in der Tab. 3-1 aufgeführt. Chromatographische Apparaturen und Methoden werden Molekül bezogen in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben.

Tab. 3-1: Verwendete Laborgeräte

Gerät	Modell	Hersteller
Atomabsorptionsspektrometer	AAS 4100	PerkinElmer Inc
Autoklav	GVA 4.6	Gossner
	VARIOKLAV	H+P Labortechnik GmbH
Brutschrank	TH 25	Edmund Bühler GmbH
	B 6420	Heraeus
Bürette	Bürette Digital	BRAND GmbH + CO KG
Continuous Flow Analyser	SAN ^{PLUS} SYSTEM	Skalar Analytical B.V.
Dispenser	FORTUNA POLYFIX 10	Poulsen & Graf Ltd.
	TECHCOLOR 5-30 ml	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG
Elementaranalysator	Vario MAX CNS	Elementar Analysensysteme GmbH
Eudiometer-Apparatur	400 ml, 5 ml Skalierung	Ochs GmbH
Gasmessgerät	GA 94 (0-100 % CH ₄ /CO ₂ , 0-25 % O ₂ , Messgenauigkeit ± 1-3 %)	Analytische Systeme und Komponenten GmbH
Gerät zur Faseranalyse	ANKOM 2000	ANKOM Technology
	Fibertec System M 1020	Foss Deutschland GmbH
Gefriertrockner	ALPHA 1-4, LOC-1M	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH
	LMC 1 Typ: 101600	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH
Häcksler	Kompostmeister 3000	Cramer GmbH
Heizgerät	LR 1	Edmund Bühler GmbH
Kjeldahl-Aufschluss	Unit K-435	BÜCHI Labortechnik GmbH
Kjeldahl-Destillation	Unit K-350	BÜCHI Labortechnik GmbH
Kjeldahl-Gaswäscher	B-414	BÜCHI Labortechnik GmbH
Magnetrührer	R 1000	CARL ROTH GmbH & Co KG
	HI 200 M	HANNA INSTRUMENTS GmbH
	HI 300 N	HANNA INSTRUMENTS GmbH
Magnetrührer mit Heizplatten	SB162-3	Dunn Labortechnik GmbH
Muffelofen	L 9/S	Nabertherm GmbH
pH-Meter	pH 95	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH
	HI 8314	HANNA INSTRUMENTS GmbH
pH/Ion-Meter	pMX 3000	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH
Presse (Obst-Beeren-Saft-Wein)	V 20 INOX (Bj. 2008)	Stabilo Fachmarkt GmbH
Rührsystem	Telesystem 06.40/15.40/60.40 + Telemodul 20	Thermo Fisher Scientific Inc.

Gerät	Modell	Hersteller
	RT 5	IKA® Werke GmbH & Co. KG
Siebmaschine	AS 200	Retsch GmbH & Co. KG
Soxhlet-Extraktion	SOX THERM automatik	C. Gerhardt, Fabrik und Lager chemischer Apparate GmbH & Co. KG
Stomacher	Stomacher® 80 Lab System	Seward
	Stomacher® 400 Blender	Seward
Temperierbad	TS 2	IKA® Werke GmbH & Co. KG
Timer	KT 188	CARL ROTH GmbH & Co KG
Trockenschrank	Modell 400	MEMMERT GmbH + Co. KG
	Modell 600	MEMMERT GmbH + Co. KG
UV/VIS-Spektrometer	Spekol 11	Carl Zeiss AG
Vortex-Mixer	IP 40 Lab Dancer	IKA® Werke GmbH & Co. KG
Wasserbad	WB 22	MEMMERT GmbH + Co. KG
	W 270	MEMMERT GmbH + Co. KG
Waage	ABT 320-4M (<320 g)	Kern & Sohn GmbH
	EMB 1200-1 (<1200 g)	Kern & Sohn GmbH
	572-49 (<5100 g)	Kern & Sohn GmbH
	1907 004 (<5550 g)	Sartorius AG
	CGB (<16.000 g)	Kern & Sohn GmbH
Zentrifuge	T 23	Janetzki
Zerkleinerer	Schneidmühle SM 100	Retsch GmbH & Co. KG

3.2 Materialien

3.2.1 Energiepflanzen



Abb. 3-1: Maisernte (Fehrbellin, 2005)

Für die Versuche wurden Mais-Ganzpflanzen der Erntejahre 2005 und 2006 verwendet. Diese stammten von der Rhinmilch GmbH Agrargesellschaft (Fehrbellin, Brandenburg). Roggen-Ganzpflanzen wurden vom Hof des Landwirtes Martin Schulze (Dolgelin, Brandenburg) in den Erntejahren 2006 und 2007 bezogen. Die Vorzerkleinerung des Ernteguts erfolgte

über Feldhäcksler (Abb. 3-1). Häcksellängen von 4 und 8 mm wurden am Gerät eingestellt, und folglich zwei unterschiedliche Fraktionen an Mais und Roggen erhalten. Nach der Ernte waren die Pflanzenhäcksel schnellstmöglich zu mischen, im Labormaßstab einzusilieren (Abschnitt 4.5) und Mengen von rund 300 g für die Bestimmung der Trockensubstanz und Rohasche der Gesamtmenge zu entnehmen. Weiterhin wurde eine bestimmte Menge an Pflanzenmaterial ge-

friergetrocknet und auf 1 mm zerkleinert, so dass sich für Inhaltsstoffanalysen rund 50 g trockene Substanz ergaben. Zwei Portionen á 50 g waren zur Bestimmung flüchtiger Bestandteile, des pH-Wertes sowie des Gehaltes an löslichen Kohlenhydraten bei -18 °C einzufrieren. Teile von ca. 500 g der frischen Häcksel wurden für weitere Untersuchungen bei -18 °C bis zur Verwendung eingefroren.

3.2.2 Modellsubstrate

Für die Bestimmung von cellulolytischen, hemicellulolytischen, pektinolytischen und ligninolytischen Enzymaktivitäten der verwendeten kommerziellen Enzympräparate wurden die in Tab. 3-2 aufgeführten Modellsubstrate eingesetzt. Vor dem Einsatz im Laborversuch erfolgte eine Überprüfung der Modellsubstrate auf Stärkekomponenten. Diese können Bestandteil von aus Pflanzen gewonnenen Substraten, im Speziellen Xylan, sein. In Enzympräparaten enthaltene Amylasen können Stärkebestandteile spalten, Kohlenhydrate aus Stärke freisetzen und somit das Ergebnis der Enzymaktivitätsbestimmung verfälschen. Zur qualitativen Untersuchung auf Stärke wurden die 0,1 %igen Modellsubstrate mit einer Iod-Kaliumiodid-Lösung (Lugolsche Lösung) versetzt. Iod führt in Anwesenheit von Stärke zu einer Blaufärbung der Probe. Eine Blindprobe mit gelöster Stärke (0,1 %) wurde zum Vergleich der Blaufärbungen mitgeführt. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Modellsubstraten konnte unter den aufgeführten Bedingungen keine Stärke nachgewiesen werden.

Tab. 3-2: Charakterisierung der Modellsubstrate

Substrat	Hersteller	Zellwandbestandteil*	Eigenschaften
Natrium-Carboxymethyl-cellulose (Na-CMC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Homogene Cellulose	Mittlere Viskosität
Filterpapier (FP) (Sorte Nr. 1)	Whatman GmbH	Heterogene Cellulose	Größe: 1x6 cm Ø 0,05 g (VarK: 2,7 %)
Arabinogalactan (AG) (Lärchenholz)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Hemicellulose	Geringe Viskosität
Arabinoxylan (AX) (Weizen)	Megazyme International Ireland Ltd.	Hemicellulose	Mittlere Viskosität Ara 38 %/Xyl 62 %
Glucomannan (GM) (Konjac)	Megazyme International Ireland Ltd.	Hemicellulose	Hohe Viskosität Glc 40 %/Man 60 %
Pektin (PE) (Apfel)	Herbstreith & Fox KG	Pektin	Veresterungsgrad 70 %
2,6-Dimethoxyphenol (Syringol, DMP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Lignin	M 154,17
Guaiaicol (2-Methoxyphenol, GU)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Lignin	M 124,14

*Das eingesetzte Substrat repräsentiert den genannten Zellwandbestandteil; VarK = Variationskoeffizient, Ara = Arabinose, Xyl = Xylose, Glc = Glucose, Man = Mannose, M = Molare Masse [g/mol]

Da jedoch die Ergebnisse bei Xylan und Pektin nicht eindeutig ausfielen, wurde fortführend der Gehalt an Stärke und D-Glucose durch enzymatische Test-Kits (Boehringer Mannheim,

R-BIOPHARM AG) bestimmt. Der Gehalt an D-Glucose von Pektin lag bei 0,1 %. In Bezug auf Xylan konnte unter den verwendeten Bedingungen keine Glucose nachgewiesen werden. Pektin und Xylan wiesen sehr geringe Stärkegehalte von < 1 % bzw. < 0,1 % auf. Diese Werte sind hinsichtlich der enzymatischen Aktivitätsbestimmungen vernachlässigbar.

Glucomannan wurde als 1 %ige Lösung (pH 4,5) qualitativ auf reduzierende Endgruppen untersucht. Als Vergleich diente eine 1 %ige Lösung von Arabinogalactan. Reduzierende Zucker bilden mit Fehling-Reagenz einen roten Niederschlag. Die Aldehydgruppen in den Kohlenhydraten werden zu Carbonsäuren oxidiert und mit Tartrat komplexierte Cu^{2+} -Ionen der Reagenzlösung zu ziegelrotem Kupfer(1)-oxid reduziert. Der Test fiel positiv aus. Es wurde weiterhin beobachtet, dass sich ein gewebeartiger Feststoff bildete.

3.2.3 Enzympräparate

Enzyme gleicher Art aus unterschiedlichen Organismen zeigen oft differierende Substrataffinitäten, daher wurden unterschiedliche kommerzielle Enzympräparate verschiedener Herkunft (Bakterien, Schimmelpilze, Pilze) hinsichtlich ihrer Enzymaktivitäten gegenüber ausgewählten Modells substraten untersucht, in Tab. 3-3 charakterisiert. Zum Einsatz kamen Enzyme unterschiedlicher Nutzungsarten, welche in der darauffolgenden Tab. 3-4 aufgeführt sind.

Tab. 3-3: Charakterisierung der Enzympräparate

Versuchs- bezeichnung	Produkt- bezeichnung	Hersteller	Enzym	Nebenaktivitäten	Mikrobielle Herkunft	pH-Optimum	Temperatur-Opt.
A1	R32	SternEnzym GmbH & Co. KG	Cellulase	β -Glucanase, Xylanase	<i>Trichoderma reesei</i>	5-6	40
A2	R31	SternEnzym GmbH & Co. KG	Cellulase	β -Glucanase, Xylanase, Amylase, Protease	<i>Aspergillus niger</i>	4	60-65
A3	30430	SternEnzym GmbH & Co. KG	Cellulase	β -Glucanase, Amylase, Hemicellulase	<i>Acremonium sp.</i>	3,5-4	50
B1	Rapidase® TF	DSM	Pektinase	Hemicellulase, Cellulase	<i>Aspergillus niger</i> <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	4-5	50
B2	Filtrase® BR	DSM	Hemicellulase	β -Glucanase, Protease, α -Amylase	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Disporotrichum dimorphosp.</i>	4-5,5	40-65
B3	Cytolase® CL	DSM	Cellulase	Nicht bekannt	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	4-6	50
B4	Rapidase® ADEX P	DSM	Pektinase	Hemicellulase, Cellulase	<i>Aspergillus niger</i>	3-5	50
C1	MethaPlus® L 100	Biopract GmbH	Cellulase	β -Glucanase, Xylanase	<i>Trichoderma reesei</i>	4,5-5,5	55-60
C2	Pektinase L 100	Biopract GmbH	Pektinase	Cellulase, Protease, Hemicellulase	<i>Aspergillus niger</i>	3,5-5,5	50
Laccase A	Laccase A	ASA Spezialenzyme GmbH	Laccase	Nicht bekannt	<i>Agaricus bisporus</i>	5,6	50-60
Laccase C (L)	Laccase C	ASA Spezialenzyme GmbH	Laccase	Nicht bekannt	<i>Trametes sp.</i>	5	70

Tab. 3-4: Industrielle Einsatzgebiete der Enzympräparate und Dosierempfehlungen der Hersteller

Versuchs- bezeichnung	Anwendungsbereich	Dosierung [g/t]
A1	Brot- und Backwarenindustrie	-
A2	Brot- und Backwarenindustrie	-
A3	Brot- und Backwarenindustrie	-
B1	Produktion von Püree, Fruchtpulver und klarem/trüben Fruchtsaftkonzentrat von Mango, Guave und anderen tropischen Früchten und Steinfrüchten	50-200
B2	Bierherstellung (Filtrationsprozesse)	200-1000
B3	Frucht- und Gemüsesaftextraktion	50-100
B4	Tresterbehandlung (Apfel, Birne)	200-400
C1	Biogasproduktion	100
C2	Fruchtsaftgewinnung (Orangen und andere Früchte)	100-200
Laccase A	Oxidation von ein- und mehrwertigen phenolischen Verbindungen (Analytik von Phenolen, Herstellung von Mikrobiziden, Enzymatische Bräunung von Lebensmitteln etc.)	-
Laccase C (L)	Umsetzung von phenolischen Verbindungen in huminstoffähnlichen Polymeren, Oxidation von ortho- und para-Diphenolen	-

3.2.4 Pilzsubstrate

Erstmalig kamen Pilzsubstrate aus der Speisepilzproduktion des Pilzhofes Dr. Schulz (Werneuchen/Brandenburg) als Substituenten für kommerzielle Enzympräparate zum Einsatz. Dafür wurden Baumpilzarten ausgewählt, welche eine enorme Enzymvielfalt zum Abbau der Hauptbestandteile von Lignocellulose aufweisen. Zur Anwendung kamen während ausgewählter Stufen des Biogasprozesses Nebenprodukte der Speisepilzproduktion folgender Weißfäulepilze: Shiitake (*Lentinula edodes*) oder Austernseitling (*Pleurotus ostreatus*). Die genannten Pilzarten gelten in der Fachliteratur als Produzenten eines komplexen Spektrums an Enzymen zum Abbau holzartiger Strukturen. Auf verschiedenen Substraten kultivierte Pilze wiesen in hergestellten Extrakten extracelluläre Hydrolasen und Oxidasen wie Exo-/Endo-Cellulase, Cellobiase, β -Glucosidase, Xylanase, Mannanase, β -Mannosidase, α -Galactosidase, α -Arabinosidase, Laminarinase, Pachymanase, Pustulanase, Chitinase, β -Glucosaminidase, Laccase, Ligninase, Saure Phosphatase, Saure Proteinase, Mannitoldehydrogenase, Fructose-6-Phosphatase, Mannitol-1-Phosphatase und Fructokinase, Pectinase und Amylase auf. Dabei ist das lignocellulolytische Material ein wichtiger Faktor bezüglich des lignocellulolytischen Potenzials des Pilzes. Durch ein Variieren des lignocellulolytischen Substrates kann das Enzymsystem bzw. das Verhältnis von hydrolytischen und oxidativen Enzymen beeinflusst werden. [Regina *et al.*, 2008; Elisashvili *et al.*, 2008; Mishra & Leatham, 1990; Kulkarni, 1990]

Das faserreiche Wachstumssubstrat wird bei der Kultivierung des Pilzes von einem Hyphennetzwerk (Myzel) durchzogen, dessen Ausläufer die eigentlichen Orte der Holzersetzung sind und den Pilz mit Nährstoffen versorgen. Die zur Fortpflanzung dienenden Fruchtkörper werden geerntet und als Speisepilze angeboten. Die Brutblöcke, bestehend aus 62,5 % Wasser, 36,5 % Buchenholz/Getreide (1:1) und 1 % Kalk, und die Fruchtkörper der in der Arbeit verwendeten Pilzsorten sind in Abb. 3-2 dargestellt. Der Reststoff, das enzymhaltige Wachstumssubstrat, auch als Pilzsubstrat bezeichnet, welches Myzel und Pilzreste enthalten kann, wurde nach der zweiten Pilzernte zerkleinert und als gehäckseltes Substrat oder als aus dem gehäckselten Material gepresster Saft (Abb. 3-3) für Untersuchungen eingesetzt. Die Pilzsubstrate waren kühl bei -4 °C zu lagern und zügig zu verwerten, da diese nicht durch geeignete chemische oder biologische Mittel stabilisiert wurden. Dementsprechend kann eine rasche Abnahme der Enzymaktivitäten erfolgen [Tan & Wahab, 1997]. Bei Lieferung der Pilzsubstrate wurden diese sofort hinsichtlich der Trockensubstanz, organischen Trockensubstanz und Rohasche untersucht. Für weitere Analysen war ein Teil der frischen Substrate zu gefriertrocknen und auf 1 mm zu mahlen und der restliche Teil einzufrieren.



Von links nach rechts: Shiitake-Substratblock, Austernseitling-Substratblock, Querschnitt eines abgeernteten Substratblockes

Abb. 3-2: Pilzkultivierung



Von links nach rechts: Shiitake-Substrat, Austernseitling-Substrat, Presssaft

Abb. 3-3: Pilzsubstrate für den Biogasprozess

Jeweils zwei entnommene und bei -18 °C tiefgefrorene Portionen der Pilzhäcksel á 50 g dienen zur Bestimmung des Gehaltes an flüchtigen Bestandteilen, des pH-Wertes und der wasserlöslichen Kohlenhydrate. Die Versuchsbezeichnungen der Varianten des Shiitake und des Austernseitlings sowie die Einsatzgebiete der hergestellten Pilzsubstrate in dieser Arbeit können der Tab. 3-5 entnommen werden.

Tab. 3-5: Anwendung der Pilzsubstrate des Shiitake (ST) und des Austernseitlings (AS)

Versuchsbezeichnung	Substrat	Beschaffenheit	Untersuchungen
ST-1	Shiitake	Häcksel	Enzymaktivitätsbestimmungen
ST-2	Shiitake	Häcksel	Enzymierung während der Silierung
ST-3	Shiitake	Presssaft	Enzymierung während des Biogasprozesses
AS-1	Austernseitling	Häcksel	Enzymaktivitätsbestimmungen
AS-2	Austernseitling	Häcksel	Enzymierung während der Silierung
AS-3	Austernseitling	Presssaft	Enzymierung während des Biogasprozesses

3.2.5 Inokulum

Als Impfmateriel für die Biogaspotenzialbestimmungen kam ein Faulschlamm des Klärwerks Wandsdorf (Schönwalde-Glien/Berlin) zum Einsatz. Dieser wurde, dem Versuch zeitnah, einem Faulbehälter entnommen, der pH-Wert gemessen, mehrere Portionen á 500 g entnommen und für weitere Versuche bei -18 °C eingefroren. Ein Teil des gefrorenen Faulschlammes wurde gefriergetrocknet, so dass rund 50 g trockenes Untersuchungsmateriel für Inhaltsstoffanalysen zur Verfügung stand. Ein „Aushungern“ der im Faulschlamm enthaltenen Mikroorganismenflora zur Absenkung der Eigengasproduktion konnte durch eine fünftägige Lagerung des frischen Faulschlammes vor dem Versuchsbeginn erreicht werden [VDI 4630, 2006].

3.3 Methoden

3.3.1 Bestimmung der Enzymaktivitäten

3.3.1.1 Nachweis der Cellulase-, Hemicellulase- und Pektinaseaktivität

Die zu ermittelnde Enzymaktivität wird durch die Enzymmenge gekennzeichnet, die 1 µmol an reduzierenden Kohlenhydratäquivalenten pro Minute freisetzt. Die reduzierenden Halbacetalgruppen der freigesetzten Kohlenhydrate lassen sich durch 3,5-Dinitrosalicylsäure qualitativ und quantitativ nachweisen. 3,5-Dinitrosalicylsäure (DNSS) wird unter alkalischen Bedingungen dabei zu 3-Amino-5-nitrosalicylsäure reduziert und die Aldehydgruppe der Kohlenhydrate zu einer Carboxylgruppe oxidiert, was zu einem Farbumschlag von gelb nach rot führt. DNSS dient ebenso zum Stoppen der Enzymreaktion nach gewünschter Inkubationszeit. Die Konzentration der 3-Amino-5-nitrosalicylsäure wird photometrisch bei 530 nm vermessen und entspricht der Konzentration an neu gebildeten reduzierenden Endgruppen. [Miller, 1959]

Bei jedem Substrat fand ein standardisierter Reaktionsablauf statt. Die Anwendung einheitlicher Versuchsbedingungen bei der Bestimmung der Enzymaktivität für die in den eigenen Arbeiten verwendeten Enzympräparate ermöglichte einen direkten Vergleich der experimentellen Ergebnisse. Es wurde ebenso eine Vergleichbarkeit durch den Bezug auf 1g eingesetztes Präparat erzielt.

3.3.1.1.1 DNSS-Methode

Zur Ermittlung der Enzymaktivitäten bezüglich der Modellsubstrate Natrium-Carboxymethylcellulose, Arabinogalactan, Arabinoxylan, Glucomannan und Pektin wurden diese mit Enzymlösung versetzt und unter ausgewählten Bedingungen inkubiert. [König *et al.*, 2002; Ghose, 1987] Einerseits kam der für Silagen typische pH-Wert von 4,5 und eine Temperatur von ca.

30 °C zum Einsatz, andererseits wurden die für Biogasfermenter typischen Bedingungen einer mesophilen Vergärung (pH-Wert 7,5; Temperatur 38 °C) angewendet.

Herstellung der DNSS-Lösung

- 20 g 3,5-Dinitrosalicylsäure/1 Liter dest. Wasser
- Hinzufügen von 400 ml 2 N Natriumhydroxid
- Erwärmen auf 50 °C
- Hinzufügen von 600 g Kaliumnatriumtartrat

Puffer

- pH 4,5: 0,05-molarer Natriumacetat-Puffer
- pH 7,5: 0,05-molarer TRIS-Puffer

Substratherstellung

Es wurden 1 %ige Substratlösungen, ausgenommen Glucomannan mit 0,5 %, verwendet. Na-CMC und Pektin waren vor der Anwendung zum vollständigen Auflösen aufzukochen. Arabinoxylan und Glucomannan wurden mit 8 ml 95 %igem Ethanol suspendiert und nachfolgend mit Pufferlösung versetzt und aufgekocht.

Herstellung der Enzymlösungen

Die Enzymlösungen waren 0,2 %ig und wurden, Substrat bezogen, mit einer bestimmten Menge an Pufferlösung verdünnt. Für die Substrate Na-CMC und Glucomannan lag die Enzymverdünnung bei 1:50/60/70 und für Arabinogalactan, Arabinoxylan und Pektin bei 1:80/90/100. Am Beispiel von Na-CMC und Glucomannan soll die Vorgehensweise der Enzymverdünnung beschrieben werden. Pro Aktivitätsbestimmung wurde das Enzym zu 0,2 g in drei verschiedene Messkolben eingewogen, mit 50 ml Pufferlösung versetzt, 20 Minuten gerührt und mit Pufferlösung auf 100 ml aufgefüllt. Die erste Lösung wurde 1:50 und 1:60 verdünnt, die Zweite 1:70 bzw. 1:50 und die Letzte 1:60 sowie 1:70, wodurch sechs leicht in der Konzentration differierende Enzymlösungen entstanden. Jede der sechs Enzymlösungen wurde in Zweifachbestimmung dem Modellsubstrat zugesetzt. So konnte aus einer Probenanzahl von $n = 12$ ein Mittelwert für die Enzymaktivität der Hydrolasen a_H [U/g] errechnet werden.

Inkubation

Es wurde 1 ml einer bei 30 bzw. 38 °C vorgewärmten Substratlösung mit 0,5 ml Enzymlösung versetzt und 20 Minuten in einem Wasserbad bei 30 bzw. 38 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben mit 1 ml DNSS-Lösung versetzt, auf einem Vortexer gemixt und für 5 Minuten im kochenden Wasserbad belassen. Nach einer Abkühlphase von 30 Minuten bei

16-18 °C wurden die Proben durch Zugabe von dest. Wasser auf 10 ml ergänzt und abschließend geschüttelt. Glucomannan enthaltene Proben wurden zusätzlich für 10 Minuten bei 5000 U/min zentrifugiert.

Erfassung der hydrolytischen Aktivität

Mittels einer Glucose-Eichgerade (0,5-10 µmol/ml) konnte die Menge an reduzierenden Endgruppen erfasst und die Enzymaktivität a_H [U/g] berechnet werden. Mit jeder neu angesetzten DNSS-Lösung ist eine neue Kalibrierung zu erstellen, da diese in ihrer Zusammensetzung variiert. Die relative Enzymaktivität a_H [U/g] wurde anhand der Menge an reduzierenden Endgruppen x [µmol/ml], dem Volumen der Enzymlösung V [100 ml], dem Verdünnungsfaktor der Enzymlösung F , der Inkubationszeit t [min] und der Enzymeinwaage m [g] wie folgt berechnet:

$$a_H = \frac{x \times V \times F}{t \times m} \quad (1)$$

Ebenso waren Blindwerte für jede Enzymlösung zu erstellen ($n = 6$), bei denen zu Beginn die Substratlösung (1 ml) vorgelegt, DNSS-Lösung (1 ml) hinzugefügt und abschließend die Enzymlösung (0,5 ml) zugegeben wurde. So konnten die applizierten Enzyme mit der Zugabe inaktiviert werden und mögliche Fehler durch in der Substrat- und Enzymlösung enthaltene reduzierende Zucker sowie Verfärbungen durch Substrat- und Enzymlösungen kompensiert werden. Die Blindwerte waren wie die Probenlösungen gegen einen mitgeführten Nullwert (1,5 ml Pufferlösung, 1 ml DNSS-Lösung, 7,5 ml dest. Wasser) photometrisch zu vermessen und von den Probenwerten zu subtrahieren. Anhand der Höhe des Nullwertes kann die Nutzbarkeit der kalt und dunkel zu lagernden DNSS-Lösung überprüft werden. Nimmt dieser Wert erheblich ab oder zu, deutet dies auf eine nicht brauchbare Lösung hin. Werden in der DNSS-Lösung Niederschläge beobachtet, sind diese durch ein Filtrieren oder Auflösen durch Erwärmen auf 50 °C zu entfernen.

3.3.1.1.2 Filterpapier-Methode

Die Bestimmung der filterpapiersaccharifizierenden Aktivität in U/g basiert auf der Hydrolyse der schwer abbaubaren Filterpapiercellulose und der Erfassung der dabei freigesetzten reduzierenden Gruppen mit einer Kalibrierkurve, die mit Glucose (0,5-10 µmol/ml) erstellt wurde. [Adney & Baker, 1996; Ghose, 1987]

Die verwendete DNSS-Lösung und die Pufferlösungen sind in Abschnitt 3.3.1.1.1 beschrieben.

Herstellung der Enzymlösungen

Die Enzyme wurden als 0,2 %ige Lösungen dreifach angesetzt, und jede Lösung anschließend 1:4,9 und 1:5,1 mit Pufferlösung verdünnt. Die sechs resultierenden Enzymlösungen wurden daraufhin als Zweifachansatz im Versuch eingesetzt ($n = 12$).

Inkubation

Es wurde 1 ml an Pufferlösung mit 0,5 ml verdünnter Enzymlösung versetzt und ein Filterpapierstreifen in der Größe von 1 cm x 6 cm mit einem Glasstab in die Lösung getaucht. Die Inkubation erfolgte für 20 Minuten in einem Wasserbad. Zum Abbruch der Reaktion wurden 3 ml DNSS-Lösung hinzugefügt und die Probe auf einem Vortexer homogenisiert. Die Lösung wurde daraufhin 5 Minuten gekocht, bei 16-18 °C für 30 Minuten abgekühlt und mit 20 ml dest. Wasser versetzt. Nach kräftigem Schütteln wurden die Proben zum Absetzen von Schwebstoffen 10 bis 20 min stehen gelassen.

Erfassung der hydrolytischen Aktivität

Die Messung der freigesetzten reduzierenden Kohlenhydrate erfolgte nach vorhergehend beschriebener Methodik (Abschnitt 3.3.1.1.1). Als Substratblindwert wurde für jede Enzymlösung eine Flüssigkeit aus Pufferlösung (1 ml), DNSS-Lösung (3 ml), Enzymlösung (0,5 ml) und dest. Wasser (20 ml) mitgeführt ($n = 6$). Gleich den Probenlösungen wurden diese gegen eine Nullprobe aus 1,5 ml Pufferlösung, 3 ml DNSS-Lösung und 20 ml dest. Wasser photometrisch vermessen. Nach Bildung der Differenz aus Proben- und Blindwert konnten die Enzymaktivitäten a_H nach Gleichung (1) berechnet werden.

3.3.1.2 Nachweis der Laccaseaktivität

Laccasen oxidieren die am aromatischen Ring substituierten Hydroxygruppen unter Sauerstoffverbrauch und Bildung farbiger Chinone (gelb bis rosa), deren Konzentration photometrisch bestimmt werden kann. Die Laccase-Aktivität ist definiert als die Enzymmenge, welche die Umsetzung von 1 μmol Sauerstoff pro Minute katalysiert. [Universität Göttingen, 1997]

Zum Vergleich der Enzymaktivitäten der Laccasen wurden die Maximalaktivitäten bestimmt, wohingegen in den vorangegangenen Versuchen (Kapitel 3.3.1.1) ausgewählte Enzymverdünnungen zum Vergleich der Enzymaktivitäten unterschiedlicher Enzympräparate verwendet wurden. Gleich den Nachweisreaktionen für cellulolytische, hemicellulolytische und pektinolytische Aktivitäten, kamen als Reaktionsbedingungen die Kenngrößen einer Silierung wie Biogasgewinnung sowie die im Abschnitt 3.3.1.1.1 aufgeführten Pufferlösungen zum Einsatz.

Substratherstellung

Die Substrate 2,6-Dimethoxyphenol (DMP) und Guaiacol (GU) wurden zu 0,3 g eingewogen, das Substrat DMP zusätzlich mit 0,5 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, 50 ml dest. Wasser hinzugefügt, 20 Minuten gerührt und mit dest. Wasser bis zu 100 ml aufgefüllt (20 mM). Anschließend erfolgte eine Verdünnung auf eine Konzentration von 200 µM.

Herstellung der Enzymlösungen

Die Enzymlösungen waren 1 %ig und wurden bis zum Erreichen der maximalen Enzymaktivität mit Pufferlösung verdünnt. Nach Ermittlung der optimalen Enzymkonzentration wurde diese in einer Sechsfachbestimmung angewendet.

Inkubation

Zur Bestimmung der Aktivitäten der Laccasen wurde 1 ml der bei 30 bzw. 38 °C vortemperierten Substratlösung mit 100 µl Enzymlösung versetzt, bei 30 bzw. 38 °C für 20 Minuten inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 1 ml DMSO gestoppt. Die Proben waren auf dem Vortexer zu homogenisieren, durch Eis zu kühlen und schnellstmöglich bei 468 nm photometrisch zu vermessen, da die Enzymreaktion nicht zu 100 % gestoppt wird. Gemäß den vorangegangenen Beschreibungen wurden Blindwerte durch schrittweises Zusammenfügen von bei 30 bzw. 38 °C vortemperierter Substratlösung (1 ml), Stopp-Reagenz (DMSO, 1 ml) und Enzymlösung (0,1 ml) erstellt.

Erfassung der oxidativen Aktivität

Unter Berücksichtigung der Extinktionsdifferenz der Probenwerte und Blindwerte ΔE , dem Verdünnungsfaktor der Enzymlösung F , der Inkubationszeit t [min] und dem Volumen der Enzymlösung V [0,1 ml] wurde die Aktivität für Oxidoreduktasen a_0 [U/ml] nach Gleichung (2) bestimmt:

$$a_0 = \frac{\Delta E \times F}{t \times V} \quad (2)$$

3.3.1.3 Nachweis von Enzymaktivitäten ausgewählter Pilzsubstrate

Die Herstellung der verwendeten DNSS-Lösung, der Substrat- und Pufferlösungen kann den Abschnitten 3.3.1.1 und 3.3.1.2 entnommen werden.

Herstellung der Enzymlösungen

Zur Ermittlung von Enzymaktivitäten gegenüber den Substraten Na-CMC, AX und DMP wurden die extracellulären Enzyme der gehäckselten Pilzsubstrate mit Pufferlösung nach Silva *et al.* [2005] extrahiert. Dazu erfolgte ein Dreifachansatz von 20 g Pilzsubstrat mit 260 ml Pufferlösung. Die Lösung wurde 60 min bei Raumtemperatur gerührt und in einem nächsten Schritt durch einen Faltenfilter (Whatman No. 1) filtriert. Das aufgefangene Filtrat kam unverdünnt oder mit Pufferlösung verdünnt für Aktivitätsbestimmungen zum Einsatz.

Die maximale Enzymaktivität des Extraktes wurde über Verdünnungsreihen der Enzymlösungen ermittelt. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der mittleren maximalen Enzymaktivität, wobei die drei gewonnenen Extrakte entsprechend verdünnt und jeweils zweifach im Versuch eingesetzt ($n = 6$) wurden.

Inkubation

Die Versuchsdurchführung zur Bestimmung der cellulo-, hemicellulo- und pektinolytischen sowie ligninolytischen Aktivitäten kann den Abschnitten 3.3.1.1 und 3.3.1.2 entnommen werden.

Erfassung der enzymatischen Aktivität

Die in Gleichung (1) aufgeführten 100 ml der Enzymlösung (V) zur Berechnung der Enzymaktivität a_H [U/g] von Hydrolasen wurden durch 260 ml Pufferlösung ersetzt. Die Enzymeinwaage m entsprach 20 g an eingesetztem Pilzsubstrat. Die ligninolytische Aktivität konnte nach Gleichung (2) berechnet werden, wobei die Volumina der Enzymlösungen [0,1 ml] den Extraktlösungen, welche aus den Pilzsubstraten gewonnen wurden, entsprachen.

3.3.2 Chemische Zusammensetzung der Energiepflanzen, Pilzsubstrate, Gärprodukte und Inokula

3.3.2.1 Erweiterte Futtermittelanalyse

Die kurz als „Weender-Analyse“ bezeichnete Gruppe von Methoden stellt ein weithin anerkanntes und angewandtes Untersuchungsverfahren für Futtermittel dar und wurde im Jahr 1860 in der landwirtschaftlichen Versuchsstation Weende bei Göttingen von HENNEBERG & STOHMANN ausgearbeitet. [Kirchgeßner, 1997]

Im Analysengang werden zunächst Trockensubstanz und Wassergehalt unterschieden. Die Weender-Analyse führt weiterhin zur Aufspaltung einer Probe in die Fraktionen Rohasche, Rohprotein, Rohfett und Rohfaser, welche Bestandteile der Trockensubstanz darstellen. Hinsichtlich der Rohfaser wird nur ein Teil der Gerüstsubstanzen wie Cellulose, Hemicellulose und Lignin

erfasst, da ein Teil in Lösung geht und somit gravimetrisch nicht erfasst werden kann. Zur besseren Differenzierung der Faserstoffe wurde von van Soest ein neues Analysensystem vorgeschlagen, welches zusätzlich die Quantifizierung von Cellulosen, Hemicellulosen und Ligninen erlaubt und in Kombination mit der Weender-Analyse ausgeführt werden kann. Ein weiterer Teil der organischen Substanz bleibt jedoch analytisch unerfasst und muss durch weitere Untersuchungen ergänzend quantifiziert werden. Dazu zählen unter anderem wasserlösliche Kohlenhydrate, Stärke, Pektin und organische Säuren, welche als stickstofffreie Extraktstoffe rechnerisch erfasst werden können. [Gruber, 2007; Dobberstein, 2007; Meyer *et al.*, 1999]

Für eine erweiterte Futtermittelanalyse wurde die jeweilige Probe gefriergetrocknet und auf 1 mm mit einer Schneidmühle pulverisiert. Für die Analysen war eine Probenmenge von mindestens 50 g vorausgesetzt. Die Bestimmung der Trockensubstanz, organischen Trockensubstanz und Rohasche erfolgte unter Anwendung von frischem Probenmaterial. Die Versuche wurden in Abhängigkeit von der jeweiligen Analysengenauigkeit in Zwei- oder Dreifachbestimmung durchgeführt.

Nach der Durchführung der Weender- und Van Soest-Analyse verbleibt ein „organischer Rest“, der analytisch erfasst werden kann. Dementsprechend wurde das genannte System den spezifischen Anforderungen bestimmter Proben durch zusätzlich in dieser Arbeit angewandte Analysemethoden angepasst. Zusätzlich durchgeführte Analysen und spezifische Differenzierungen, zum Beispiel hinsichtlich der Stickstofffraktionen, geben Hinweise auf Prozessstabilitäten und mögliche Einflüsse auf die Methanausbeuten. N-haltige Verbindungen beeinflussen in wesentlichem Maße den Silier- und Biogasprozess und sind daher als Prozessparameter zu analysieren. Der Gehalt an Rohprotein kann zur Bestimmung des theoretischen Methanbildungspotenziales eingesetzt werden. Nitrate und Ammoniumverbindungen stellen wichtige Nährstoffe (Edukte) für die Mikroorganismen der einzelnen Prozessstufen dar. Diese können die Qualität und Menge an Produkten im Silier- und Biogasprozess positiv sowie negativ beeinflussen und wurden daher in jeder Probe in Zwei- oder Dreifachbestimmung analysiert.

Untersucht wurden in Zwei- bis Fünffachbestimmung weiterhin die Elemente Kohlenstoff, Stickstoff und Schwefel. Kohlenstoff ist das Hauptelement jeder organischen Verbindung. Der Anteil des Kohlenstoffs gibt Auskunft über die Menge an organischer Substanz sowie im Zusammenhang mit anderen Makroelementen über das Nährstoffverhältnis in einer Probe, z. B. C/N-Verhältnis. Stickstoff ist, darauf bezogen, das zweitwichtigste Makroelement organischer Verbindungen. Sein Anteil muss sich stets in einem gewissen Verhältnis zum Kohlenstoffgehalt befinden, um eine ausgewogene Ernährung der Mikroorganismen des anaeroben Abbauprozesses

sowie der Pflanzen, an die das Gärprodukt gebracht wird, zu gewährleisten. Bei dieser Analyse wird kein Ammonium-Stickstoff, jedoch jener aus Nitrat und Nitrit mit erfasst. Schwefel ist als eines der wichtigsten Mikroelemente von physiologischer Bedeutung, außerdem für die unerwünschte Bildung von Schwefelwasserstoff im Biogas verantwortlich. Somit ist es von Interesse, den Anteil an Schwefel in den Substraten und dessen Veränderung im Verlauf des Gärprozesses zu kennen. Es wird neben organischem Schwefel auch Sulfat und Sulfit detektiert.

Das Einbeziehen wasserlöslicher Kohlenhydrate lässt eine weitere Charakterisierung des „organischen Restes“ zu. Bei den wasserlöslichen Kohlenhydraten handelt es sich hauptsächlich um Mono- und Disaccharide. Für eine erfolgreiche Silierung ist ein Mindestgehalt von über 2 % in der Frischmasse Voraussetzung [Kamphues *et al.*, 1999]. Kohlenhydrate stellen dem hinzufügend Abbauprodukte der enzymatischen Vorbehandlung des Ernteguts oder mikrobieller Stoffwechselvorgänge während der Silierung und sehr leicht vergärbare Produkte für die Methanisierung dar und wurden daher in allen Probenmaterialien in Zwei- oder Dreifachbestimmung untersucht.

Impfmateriel wird dem Biogassubstrat im Überschuss zugesetzt. Die chemische und mikrobiologische Zusammensetzung des Inokulums kann die Biogasausbeute beeinflussen, insbesondere durch hohe Schwermetallgehalte. Demzufolge wurden in ausgewählten Inokula die enthaltenen Konzentrationen an selektierten Spurenelementen und Schwermetallen in Dreifachbestimmung ermittelt. Dadurch ist eine Abschätzung des Potenzials bezüglich einer Förderung oder Hemmung des Biogasprozesses möglich.

Wurde der pH-Wert nicht über eine Kaltwasserextraktion, wie in Abschnitt 3.3.2.2 aufgeführt, oder direkt im Medium gemessen, war eine Verdünnung der Substanz mit dest. Wasser von 1:5 durchzuführen, und der pH-Wert in der hergestellten Suspension zu messen.

Eine Übersicht der angewendeten Methoden gibt Tab. 3-6 wieder. Zur Anwendung kam bei der Charakterisierung des „organischen Restes“ wie bei der klassischen Futtermittelanalyse gefriergetrocknetes und auf 1 mm gemahlenes Probenmaterial. Erntegut und Silagen wurden zur Bestimmung des Gehaltes wasserlöslicher Kohlenhydrate oder des Nitrats in frischer Form verwendet, und wie in Abschnitt 3.3.2.2 aufgeführt, bearbeitet.

Da der Stoffabbau im Pansen, vor allem in den ersten Schritten, in sehr ähnlicher Weise wie bei der Fermentation zur Biogasgewinnung abläuft, können die Analysenwerte dieser Untersuchungsverfahren in Übereinstimmung mit eigenen Erfahrungen zur Beurteilung der Abbaubarkeit von Substraten sowie der Abbauleistung von Fermentationsprozessen herangezogen werden.

Tab. 3-6: Methodenübersicht

Parameter	Methode/Quelle
Trockensubstanz	VDLUFA Bd. III, 3.1, Trocken bei 105 °C
Organische Trockensubstanz/Rohasche	VDLUFA Bd. III, 8.1, Veraschen bei 550 °C
Rohprotein	VDLUFA Bd. III, 4.1.1, Kjeldahl x 6,25
Rohfett	VDLUFA Bd. III, 5.1.1, Soxtherm
Rohfaser	VDLUFA Bd. III, 6.1.1, Ankom Analyzer
Stickstoff-freie Extraktstoffe	100-(Rohasche+Rohprotein+Rohfett+Rohfaser)
NDF - Neutral Detergent Fiber	VDLUFA Bd. III, 6.5.1, van Soest <i>et al.</i> 1991, Tecator
ADF - Acid Detergent Fiber	VDLUFA Bd. III, 6.5.2, van Soest <i>et al.</i> 1991, Tecator
ADL - Acid Detergent Lignin	VDLUFA Bd. III, 6.5.3, van Soest <i>et al.</i> 1991, Tecator
Cellulose	ADF - ADL
Hemicellulose	NDF - ADF
Wasserlösliche Kohlenhydrate	Continous Flow Analyzer, Lengerken und Zimmermann 1991
Nitrat	Continous Flow Analyzer
Ammonium-Stickstoff	VDLUFA Bd. III, 4.8.1, Kjeldahl
Kohlenstoff/Stickstoff/Schwefel	VDLUFA Bd. III, 4.1.2, vario MAX
Calcium	Atomabsorptionsspektroskopie
Kalium	Atomabsorptionsspektroskopie
Magnesium	Atomabsorptionsspektroskopie
Phosphor	Continous Flow Analyzer
Blei	Atomabsorptionsspektroskopie
Cadmium	Atomabsorptionsspektroskopie
Chrom	Atomabsorptionsspektroskopie
Eisen	Atomabsorptionsspektroskopie
Kupfer	Atomabsorptionsspektroskopie
Nickel	Atomabsorptionsspektroskopie
Zink	Atomabsorptionsspektroskopie
pH-Wert	VDLUFA Bd. III, 18.1; DIN EN 12176:1998-2006

3.3.2.2 Analyse flüchtiger Verbindungen

Flüchtige Verbindungen wie freie Fettsäuren sind Produkte des anaeroben Abbaus während der Silierung und des Biogasprozesses und geben Auskunft über den Erfolg der Silierung sowie den Zustand des Fermentationsprozesses. Zur Analyse von flüchtigen organischen Säuren, Alkoholen und Ammoniak sowie des pH-Wertes wurde frisches Probenmaterial einer Kaltwasserextraktion unterzogen. Es wurden 50 g einer gefrorenen Probe mit dest. Wasser, bei Mais 200 ml und bei Roggen 300 ml, versetzt. Das Hinzufügen von 1 ml Toluol diente dem Verhindern eines Verderbes der Probe durch unerwünschte Stoffwechselvorgänge. Nach gründlichem Rühren der Probe und Abdecken des Glases wurde dieses für ca. 24 h bei +4 °C kühl gelagert. Die so extrahierten Proben wurden durch einen Faltenfilter abfiltriert, und das Filtrat in Portionen für die einzelnen Untersuchungen aufgeteilt. Die sich anschließende Prozedur ist den nachstehenden Abschnitten zu entnehmen. Wurden die extrahierten Proben nicht zeitnah mittels Gas- bzw.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie oder Elektrode vermessen, waren diese bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ einzufrieren. Ebenfalls konnte der Gehalt an wasserlöslichen Kohlenhydraten im Filtrat bestimmt werden. Die Konzentration der ausgewählten Inhaltsstoffe wurde in Zweifachbestimmung ermittelt.

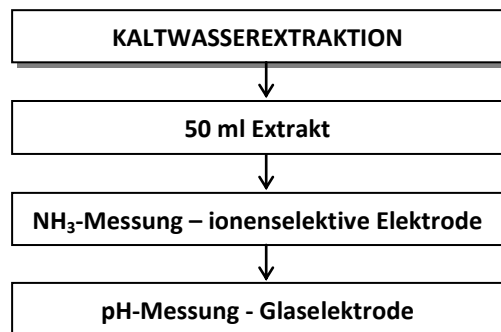


Abb. 3-4: Bestimmung von NH_3

Ionen werden vom Kronenether auf der Membranoberfläche festgehalten. Es bildet sich, abhängig von der Ionenkonzentration, ein Potenzial auf der Membranoberfläche, das durch den Innenelektrolyten an den Ableiter übertragen wird. Dieses Meßsystem benötigt, analog der pH-Meßelektrode, eine Referenzelektrode (Zweistabmesskette), die das gemessene Potenzial in Relation zum elektrischen Nullpunkt der Messlösung stellt.

Ammoniak (NH_3), pH-Wert

Zur Messung von Ammoniak wurde die Ionen-Selektive-Elektrode genutzt (Abb. 3-4). Der wichtigste Teil dieses Elektrodentyps ist die Membran, die nur einen Ionentyp durchläßt. Sie besteht aus PVC und ist auf ihrer zur Messlösung zeigenden Seite mit einem Kronenether beschichtet. Mittels Kronenether wird eine Formselektion vorgenommen. Die selektierten

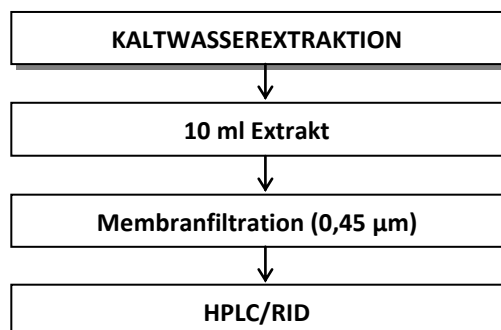


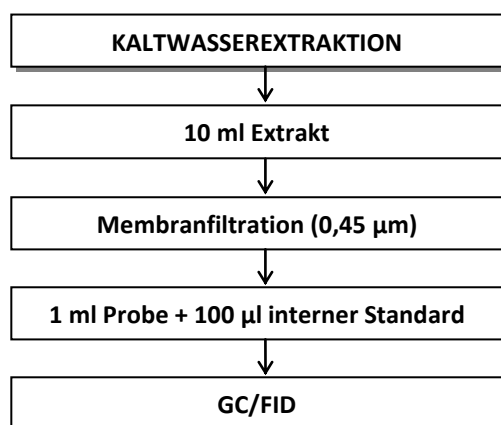
Abb. 3-5: Bestimmung von Milchsäure

Wasserdampfvlüchtige organische Säuren, Alkohole

Die Kenntnis der Konzentration der einzelnen kurzkettigen Monocarbonsäuren, deren Verhältnis zueinander sowie ausgewählter alkoholischer Verbindungen ermöglichen differenzierte Aussagen über den Zustand einer Vergärung. Desweiteren stellen die organischen Säuren sowie Alkohole ein wesentliches Gasbildungspotenzial dar. Von daher ist die Auftrennung und quantitative Bestimmung ausgewählter wasserdampfvlüchtiger Fettsäuren und Alkohole zweckmäßig. Dazu zählen: Milchsäure (MiS), Essigsäure (ES), Propionsäure (PS), iso-Buttersäure, n-Buttersäure (BS = iso/n-Buttersäure), iso-Valeriansäure, n-Valeriansäure (VS = iso/n-Valeriansäure, n-Caprionsäure (CS), Ethanol, Aceton, Methanol, n-Propanol, 1,2-Propan-

diol, 2,3-Butandiol, iso-Propanol, 2-Butanol und 1-Butanol. Milchsäure wurde mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Brechungsindexdetektor (RID) nachgewiesen (Abb. 3-5). Durch eine externe Kalibration konnte Milchsäure quantifiziert werden. Das Messsystem wird im Folgenden näher beschrieben:

HPLC-System:	KONTRON
Automatik-Sampler	HPLC 360
Pumpe	System 325 (isotherm, isobar)
Säule	Polypore H, Brownlee Lab
Säulenofen	Column oven 480 (80 °C)
Detektor	RI-Detektor, Knauer GmbH
Auswertung	Datensystem DS459-MT2
Mobile Phase	0,01 N Schwefelsäure
Probevolumen	20 µl



Die Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor (GC/FID) diente zur Analyse der oben aufgeführten organischen Säuren und verschiedener Alkohole, ausgenommen Milchsäure. Die Gehalte der Alkohole wurden aufsummiert und als Gesamtalkoholkonzentration angegeben. Die Proben, mit einem Volumen von 1 ml, wurden direkt vor der Injektion mit 100 µl des internen Standards versetzt und anschließend chromatographisch quantifiziert (Abb. 3-6).

Abb. 3-6: Bestimmung von flüchtigen Säuren und Alkoholen

Der interne Standard setzte sich aus 1 g iso-Capronsäure, 60 ml Ameisensäure und 39 ml dest. Wasser zusammen. Das Meßsystem wird nachstehend charakterisiert.

GC-System:	SHIMADZU
Automatik-Sampler	AOC-1400
Gas-Chromatograph	GC-14A
Säule	Permabond FFAP-DF-0,25; Fused Silica Kapillarsäule, 25 m x 0,32 mm; Macherey-Nagel GmbH & Co.KG
Detektor	FI-Detektor (Brenngase: Wasserstoff, Luft)
Integrator	C-R4AX
Temperaturprogramm	Stufe 0: 40 °C für 3 min

Stufe 1: Rate 15 °C/min, 110 °C für 1 min (Haltezeit)

Stufe 2: Rate 12 °C/min, 170 °C für 2 min (Haltezeit)

Mobile Phase Stickstoff

Probevolumen 1 µl

3.3.2.3 Bestimmung des Gehaltes an reduzierenden Kohlenhydraten

Nach der enzymatischen Behandlung der Silagen direkt vor dem Biogasprozess wurden die Proben auf den Gehalt an reduzierenden Kohlenhydraten untersucht. Dazu waren diese nach der Methode von Wang *et al.* [2002] vorzubereiten.

Begonnen wurde mit dem Extrahieren von 10 g Probe durch den Zusatz von 90 ml sterilem 70 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0) und einem Aufschluss für 60 Sekunden auf höchster Stufe im Stomacher. Anschließend wurde ein Aliquot von 10 ml entnommen, dieses für 10 Minuten zur Enzyminaktivierung gekocht und für 10 Minuten bei 10.000 x g zentrifugiert. Im Überstand konnten anschließend die reduzierenden Kohlenhydrate nach der im Abschnitt 3.3.1.1.1 aufgeführten DNSS-Methode gemessen werden. In ein Reagenzglas wurden 0,5 ml Probenlösung, 1 ml Pufferlösung und 1 ml DNSS-Lösung pipettiert, die entstandene Lösung für 5 Minuten gekocht, 30 Minuten abgekühlt, mit 7,5 ml dest. Wasser aufgefüllt und geschüttelt. Abschließend konnte die Probe bei 530 nm spektroskopisch vermessen werden. Es wurden jeweils zwei Silageproben direkt vor dem Biogasprozess mit Wasser, bei Pasteurisierungstemperatur und/oder mit Enzymmixture behandelt, wovon je zwei Proben nach der Behandlung zur Bestimmung des Gehaltes an reduzierenden Kohlenhydraten genommen wurden. Folglich ergaben sich vier auswertbare Messergebnisse je Variante.

3.3.3 Bestimmung der Qualitätsparameter von Silagen

Um die Qualität der Silagen zu überprüfen, wurden folgende Parameter gemessen bzw. errechnet:

- Massenverlust über die Gesamtdauer der Konservierung bzw. Lagerung der Silagen
- Dichte der hergestellten Silage
- DLG-Bewertung auf Basis der chemischen Untersuchung
- Gehalt an Hefen und Schimmelpilzen
- Vergärbarkeit und Pufferkapazität der Silagen

Massenverluste, Gärverluste

Zur Überprüfung der mengenmäßigen Verluste an niedermolekularen Substanzen der in Weckgläsern verdichteten Silagen durch Veratmung des restlichen Sauerstoffanteiles im anaeroben System und Verflüchtigung eines bestimmten Anteiles an bei der Konservierung gebildeten organischen Stoffe, wurden die Massenverluste bestimmt. Der Massenverlust M_V [g/kg] ließ sich aus dem Massenanteil an Probenmaterial M_{PE} [g], dem Gewicht des Glases M_G [g] und der Gesamtmasse an Glas und Probenmaterial M_{GPE} [g] zu Beginn der Silierung sowie der Auswaage (Glas inkl. Probenmaterial) M_{GPA} [g] nach festgesetzten Zeitintervallen wie folgt bestimmen:

$$M_G = M_{GPE} - M_{PE} \quad (3)$$

$$M_V = \frac{[M_{PE} - (M_{GPA} - M_G)] \times 1000}{M_{PE}} \quad (4)$$

Unter Zuhilfenahme des Massenverlustes M_V [g] und der Trockensubstanzeinwaage TS_E [g] konnte der Gärverlust bzw. Trockenmasseverlust G_V [%] während der Silierung nach Weißbach [1998] unter Einbezug eines Korrekturfaktors von 2,5 für gelöstes Kohlendioxid nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$G_V = 100 \times \frac{M_V}{TS_E} + 2,5 \quad (5)$$

Dichte

Die Dichte ρ [kg TS/m³] wurde rechnerisch über die Trockensubstanz TS [g/kg] des Probenmaterials zu Beginn der Konservierung und die Einwaage des Probenmaterials P_E [g/l] mit folgender Gleichung ermittelt:

$$\rho = \frac{TS \times P_E}{1000} \quad (6)$$

DLG-Bewertung

Auf der Basis der chemischen Untersuchungen kann eine Beurteilung der Gärqualität von Grünfuttersilagen aus z. B. Gras, Mais- und Getreidepflanzen erfolgen. Diese ist unabhängig vom Silierverfahren, dem Trockensubstanzgehalt und der Anwendung von Silierhilfsmitteln. Ausgeschlossen werden alkalische und verschimmelte Silagen. Als Parameter werden Merkmale des Gärungsverlaufes und des Nährstoffabbaus im Silo herangezogen. Vorrangig liefert die Beur-

teilung Aussagen über das Ausmaß an entstandenen Nährstoffverlusten, die eingetretene Abnahme des Nährstoff- und Energiegehaltes und die Lagerstabilität der Silage unter anaeroben Bedingungen. Anhand des Gehaltes bzw. dem Verhältnis an Butter- und Essigsäure und dem pH-Wert wird die Gärqualität bestimmt. Dazu wurden die Gehalte an Butter- und Essigsäure sowie der pH-Wert durch ein Punktesystem bewertet und aus der Gesamtpunktzahl ein abschließendes Urteil erstellt. [DLG, 2006]

Keimgehalt

Mittels Keimindikatoren (Mikrocount[®] combi, Schülke & Mayr GmbH) konnte ein Screening der Schimmelpilz- und Hefekeimzahl durchgeführt werden. Der Kunststoffnährbodenträger enthielt zwei verschiedene Nährböden (Tab. 3-7).

Tab. 3-7: Agarzusammensetzung

TTC-Agar (Bakterien)	Rose-Bengal-Agar (Hefen, Schimmelpilze)
Glyzerin	Pepton
Fleischextrakt	Glucose
Pepton	Dikaliumhydrogenphosphat
Natrium-Succinat	Magnesiumsulfat
Agar	Agar
TTC	Rose bengal
Natriumchlorid	Natriumchlorid
	Chloramphenicol
	Gentamycin
pH-Wert 7,1-7,4	pH-Wert 7,0-7,2

TTC = 2,3,5-Triphenyltetrazolium

Nach dem Öffnen eines Silageglases und dem Durchmischen der Silageprobe wurde jede Agarfläche eines Indikators auf verschiedene Stellen der Silageprobe gedrückt und dieser dann bei 28 °C für 48 bzw. 72 h inkubiert. Nach dem Inkubieren konnte mittels Auswertungstableau die Konzentration an mikrobieller Masse [KBE/ml] bestimmt werden.

Pufferkapazität (PK)

Die Pufferkapazität ist definiert als die Eigenschaft des Futters, einer Ansäuerung durch eine Milchsäurebildung aufgrund von in Proben enthaltenen basischen Komponenten wie Proteinen, Anionen (Nitrat, Sulfat, Chlorid), mineralstoffreiche Unkräuter und hohe Schmutzanteile im Futter entgegenzuwirken. Analytisch wurde die Menge an Milchsäure erfasst, welche zur Senkung des pH-Wertes auf 4,0 notwendig ist. [Weißbach, 1967]

Vergärbarkeitskoeffizient (VK)

Zur Grobabschätzung des Gärerfolges wurde der Vergärbarkeitskoeffizient herangezogen, welcher die Faktoren Trockensubstanzgehalt und Gäreignung in einer Kennzahl zusammenfasst. Zur Berechnung des VK wurde der Quotient aus dem Gehalt an wasserlöslichen Kohlenhydraten WSC [g/kg TS] und der Pufferkapazität PK [g MiS/kg TS] gebildet, wobei die genannten Parameter den Maßstab für die Vergärung darstellen und den Faktor angeben, um den die Zuckermenge im Siliergut größer ist, als die zum Ansäuern auf pH 4,0 erforderliche Milchsäuremenge. Ist der Koeffizient größer als 45, so wird von einer stabilen Gärung ausgegangen. Folgende Gleichung, unter Einbeziehung der Trockensubstanz TS [%], gibt die Berechnung des VK wieder [Schmidt *et al.*, 1971]:

$$VK = TS + \left(8 \times \frac{WSC}{PK}\right) \quad (7)$$

3.3.4 Berechnungsgrundlagen zur Bestimmung des Abbaugrades von Lignocellulose

3.3.4.1 Abbauleistung während der Silierung

Nach dem Bestimmen der Gehalte ausgewählter Inhaltsstoffe in den gefriergetrockneten und auf 1 mm gemahlenen Proben der Energiepflanzen Mais und Roggen vor sowie nach der Silierung konnten die Abbaugrade einzelner Inhaltsstoffe bestimmt werden. Grundlage für die Berechnungen der Abbauleistungen waren die Analysenergebnisse der Inhaltsstoffanalysen bezogen auf 100 % trockene Substanz. In Gleichung (8) ist beispielhaft die Berechnung für den Abbaugrad des Parameters „NDF“ dargestellt. Unter Anwendung der Konzentration an Trockensubstanz des Probenmaterials vor sowie nach der Silierung TS_E bzw. TS_A [%], der Ein- und Auswaage des Probenmaterials M_{PE} bzw. M_{PA} [g] und der Gehalte an NDF vor sowie nach der Silierung NDF_E bzw. NDF_A [% i.TS] konnte der Abbaugrad AG_S [%] während der Silierung berechnet werden.

$$AG_S = \frac{\left[\left(\frac{\left(\frac{NDF_E \times TS_E}{100} \right) \times M_{PE}}{100} \right) - \left(\frac{\left(\frac{NDF_A \times TS_A}{100} \right) \times M_{PA}}{100} \right) \right] \times 100}{\left(\frac{\left(\frac{NDF_E \times TS_E}{100} \right) \times M_{PE}}{100} \right)} \quad (8)$$

3.3.4.2 Abbauleistung während des Eudiometer-Gärtests

Ähnlich der Verfahrensweise in Abschnitt 3.3.4.1, wird der Abbaugrad AG_F [%] ausgewählter Inhaltsstoffe der Inokula mit Hilfe der Gleichung (9) berechnet und ist Voraussetzung für die Berechnung der Abbauraten ausgewählter Inhaltsstoffe der Biogassubstrate. Um die Inokulaauswaage des Batch-Versuches zu ermitteln, wurde ein Anteil von 0,5 % von der Einwaage abgezogen. Der angegebene Prozentsatz kommt durch die Berechnung und Mittlung von Verlusten an Probenmasse während der Batch-Versuche zustande (Daten nicht dargestellt). Somit ergibt sich für die Gleichung (9) unter Einbezug des Beispielparameters „NDF“ folgender Inhalt: Gehalt an NDF in der Probe vor bzw. nach dem Batch-Versuch NDF_{BE} bzw. NDF_{BG} [% i.TS], Trockensubstanz der Probe vor sowie nach der Methanisierung TS_{BE} bzw. TS_{BG} [%] und Masse der Probe vor sowie nach der Vergärung M_{BPE} bzw. M_{BG} [g].

$$AG_F = \frac{\left[\left(\frac{\left(\frac{NDF_{BE} \times TS_{BE}}{100} \right) \times M_{BPE}}{100} \right) - \left(\frac{\left(\frac{NDF_{BG} \times TS_{BG}}{100} \right) \times (M_{BG} - 0,5\%)}{100} \right) \right] \times 100}{\left(\frac{\left(\frac{NDF_{BE} \times TS_{BE}}{100} \right) \times M_{BPE}}{100} \right)} \quad (9)$$

Dem folgend wurden die Gehalte, bezogen auf 100 % trockene Substanz, ausgewählter Inhaltsstoffe der Biogassubstrate vor bzw. nach dem Versuch auf die im Batch eingesetzte, gemittelte, frische Probenmasse bzw. Gesamtmasse (Substrat + Inokulum) an Gärprodukt bezogen. In der Gleichung (10) bzw. (11) ist die Kalkulation beispielhaft für den Parameter „NDF“ aufgeführt. In der Gleichung (10) werden die folgenden Parameter zur Ermittlung des Frischmasseanteils von NDF im Batch-Ansatz B_{PM} [g] berücksichtigt: der NDF-Wert in der Trockenmasse NDF_{BE} [% i.TS], die Trockenmasse des frischen Materials TS_{BE} [%] sowie die Masse der frischen Substanz im Batch-Ansatz M_{BPE} [g]. Hinsichtlich der Gleichung (11) beziehen sich die Werte auf die Gesamtmasse des Gärproduktes B_{GM} [g]: NDF-Wert in der Trockenmasse NDF_{BG} [% i.TS], die Trockenmasse des Gärproduktes TS_{BG} [%] und die Masse des Gärproduktes M_{BG} [g]. Von jeder Gesamtmasse an Gärprodukt B_{GM} sind 0,5 % abzuziehen, da dies einem Mittelwert entspricht, welcher sich auf die Massenverluste der angesetzten Gärmasse während des Batch-Versuches bezieht.

$$B_{PM} = \frac{\left(\frac{NDF_{BE} \times TS_{BE}}{100} \right) \times M_{BPE}}{100} \quad (10)$$

$$B_{GM} = \frac{\left(\frac{NDF_{BG} \times TS_{BG}}{100} \right) \times (M_{BG} - 0,5\%)}{100} \quad (11)$$

Zur Berechnung des Abbaus einzelner Inhaltsstoffe der Pflanzen Mais und Roggen ist es erforderlich, den Rückstand der einzelnen Inhaltsstoffe des ohne Probenmaterial vergorenen Faulschlamm B_{FM} nach Gleichung (11) zu berechnen. Um die im Gärprodukt enthaltenen Rückstände des Mais oder Roggens B_{AM} [g] erfassen zu können, muss die Masse des spezifischen Inhaltsstoffes im Gärprodukt des Faulschlamm B_{FM} [g] von der Gesamtmasse des Gärproduktes B_{GM} [g] subtrahiert werden, siehe Gleichung (12). Anschließend wurde zur Berechnung des Abbaugrades AG_B einzelner Inhaltsstoffe des Biogassubstrates während des Batch-Versuches der prozentuale Anteil an abgebauter Masse, bezogen auf die Einwaage des Substrates beim Batch-Ansatz B_{PM} [g], bestimmt, in Gleichung (13) dargestellt.

$$B_{AM} = B_{GM} - B_{FM} \quad (12)$$

$$AG_B = \frac{(B_{PM} - B_{AM}) \times 100}{B_{PM}} \quad (13)$$

3.3.5 Verfahren zur Bestimmung des spezifischen Biogas- und Methanertrages

3.3.5.1 Eudiometer-Gärtest

Einsatz finden Batch-Tests zur Bestimmung von Biogaspotenzialen bzw. Prüfung der anaeroben Bioabbaubarkeit in Anlehnung an die VDI-Richtlinie 4630. Die Ergebnisse sind abhängig von der mikrobiellen Aktivität des verwendeten Impfschlammes, und diese wiederum von den Milieubedingungen wie Temperatur, Verfügbarkeit des Substrates und der Leistungsfähigkeit der verwendeten biologisch aktiven Masse. Daher sollte möglichst unter standardisierten Bedingungen gearbeitet werden. In den einzelnen Batch-Versuchen dieser Arbeit wurde die Temperatur mittels Wasserbäder, in denen sich die Gärgefäße befanden, konstant bei 38 °C gehalten und zu vergleichende Proben parallel in dreifacher Ausführung angesetzt.

Die Apparatur (Abb. 3-7) schließt im Wesentlichen ein 500 ml fassendes Reaktions- bzw. Gärgefäß, ein 400 ml fassendes und graduiertes Eudiometerrohr – Gassammelrohr – und ein Ausgleichsgefäß ein. Das im Steigrohr innerhalb des Eudiometerrohres aufgestiegene Biogas drückt die sich im Eudiometerrohr befindliche Sperrflüssigkeit, welche mit Salzsäure auf pH 1,5 gebracht und mit Methylorange gefärbt wurde, in das Ausgleichsgefäß. Die somit auf der Skala des Eudiometerrohres sichtbare Differenz vom Startpunkt 0 ist das als sich neu gebildete Biogas

täglich abzulesen. Sich im Eudiometerrohr angesammeltes Biogas wird durch ein Gasablasshahn mit einer Schlauchverbindung zum Gasbeutel in diesen überführt. Das für jede Variante in einem Gasbeutel gesammelte Gas wird daraufhin mittels eines Deponiegasmessgeräts auf die folgenden Bestandteile des Biogases untersucht: Methan, Kohlenstoffdioxid und Sauerstoff. Methan und Kohlendioxid werden dabei durch Infrarot-Absorption und Sauerstoff durch eine elektrochemische Zelle erfasst. Die mehrfach während einer Biogaspotenzialbestimmung analysierte Zusammensetzung des Biogases erlaubt neben der Berechnung des Methanertrages auch Rückschlüsse auf den Zustand und den Verlauf einer Gärung.

Eingesetzt wurden je Gärgefäß eine Faulschlammmenge von 300 g und das jeweilige Substrat in einer oTS-Ratio zum Faulschlamm von 0,4. Zusätzlich zu den Untersuchungsvarianten waren drei Gärgefäße nur mit Inokulum zu füllen sowie weitere drei mit einem Standard und Inokulum.

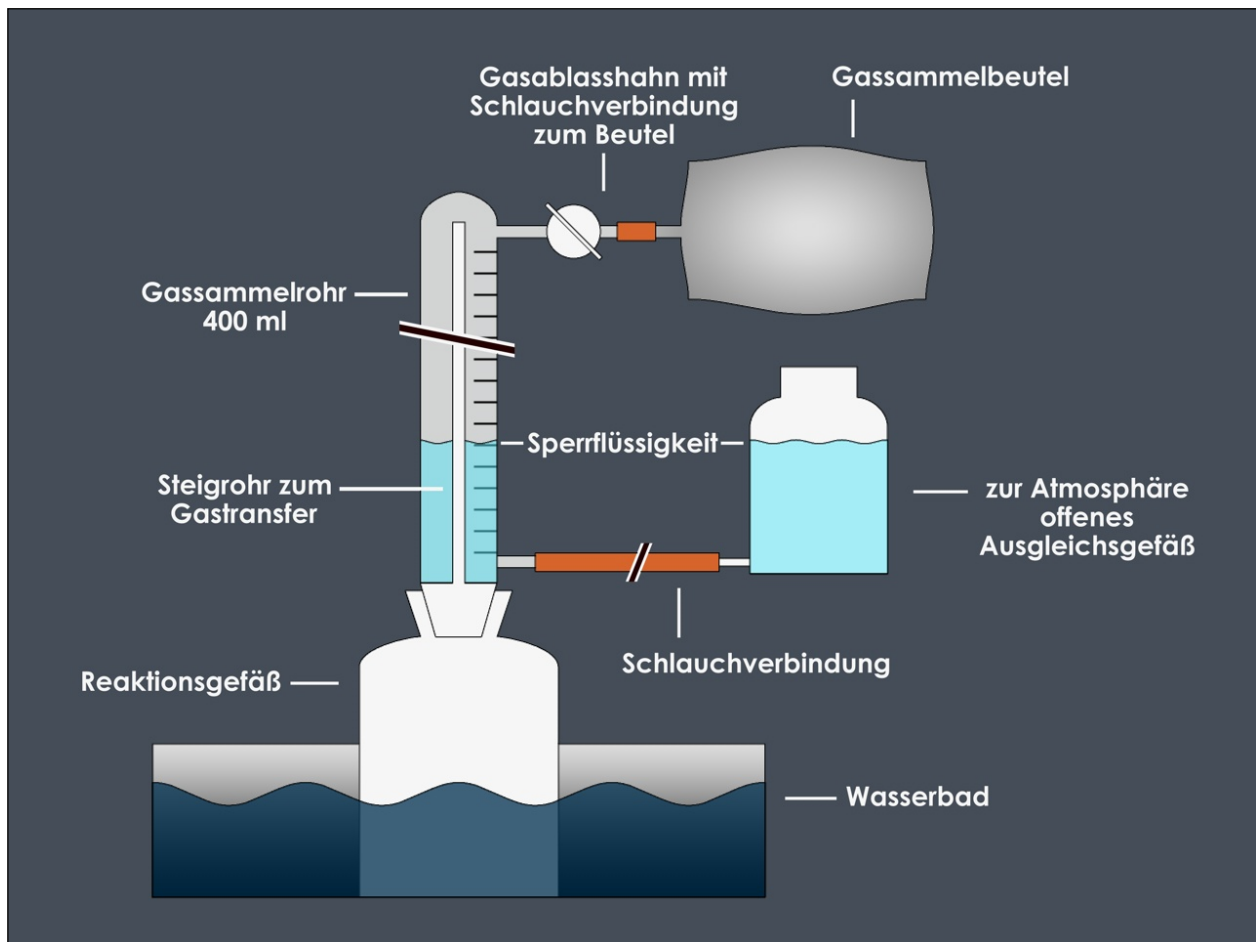


Abb. 3-7: Eudiometer-Apparatur

© Schreiter, bsmo GmbH; Schimpf, IASP; 2010

Als Standard wurde mikrokristalline Cellulose (MCC) mitgeführt. Die Verweildauer belief sich auf 35 Tage. Mit der gewählten Verweilzeit konnte sichergestellt werden, dass die Biogasbildung ein Plateau erreicht, bei welchem der Biogasertrag um weniger als 1 % pro Tag, bezogen auf die Gesamtmenge an Biogas, anstieg.

3.3.5.2 Berechnungsgrundlagen

Spezifische Biogasausbeute

Aufgrund des Apparaturaufbaus konnte vor dem täglichen Ablesen des produzierten Biogases kein Druckausgleich durchgeführt werden. Dieser wurde infolgedessen anhand einer Korrekturformel in die Berechnungen einbezogen. Dazu wurde der Überdruck des Biogases im Eudiometer über den Druck je Länge bzw. die Wassersäule [cmWS] gemessen. 1 cmWS entsprechen $0,98 \times 10^{-3}$ bar bzw. 0,98 mbar. Gleichung (14) beinhaltet zur Korrektur des Druckes $p_{\text{kor}} [\text{mbar}]$ folgende Parameter: Abstand zwischen der Aufhängung des Ausgleichsgefäßes und dem Nullpunkt der Skala des Eudiometers $r_{\text{AEgem}} [\text{cmWS}]$, Abstand zwischen dem Nullpunkt der Skala sowie dem Skalenwert 200 ml des Eudiometers $r_{\text{EEgem}} [\text{cmWS}]$, aktuell abgelesenes Biogasvolumen $V_{\text{neu}} [\text{ml}]$, Abstand zwischen der Aufhängung des Ausgleichsgefäßes und dem Wasserspiegel der Flüssigkeit des Ausgleichsgefäßes $r_{\text{AGgem}} [\text{cmWS}]$, 0,98 als Umrechnungsfaktor von cmWS auf mbar.

$$p_{\text{kor}} = 0,98 \times \left[r_{\text{AEgem}} + \left(\frac{r_{\text{EEgem}}}{200 \text{ml}} \times V_{\text{neu}} \right) - r_{\text{AGgem}} \right] \quad (14)$$

Mittels der nachstehend aufgeführten Gleichung (15) konnte für jede Variante bzw. für jedes Gärgefäß das in den einzelnen Zeitabschnitten entstandene Biogas der Mischung aus Probe und Inokulum bezogen auf Normvolumen $V_{\text{BG}} [\text{ml}]$ errechnet werden. Dabei sind folgende Parameter Bestandteil der Rechnung: aktuell abgelesenes Biogasvolumen $V_{\text{neu}} [\text{ml}]$, vorhergehend abgelesenes Biogasvolumen $V_{\text{alt}} [\text{ml}]$, Normtemperatur $T_0 [273,15 \text{ K}]$, Luftdruck zur Zeit der aktuellen Ablesung $p_{\text{gem}} [\text{mbar}]$, Korrektur des Druckes $p_{\text{kor}} [\text{mbar}]$, Dampfdruck des Wassers in Abhängigkeit von der Temperatur des umgebenden Raumes $p_{\text{W}} [\text{mbar}]$, Normdruck $p_0 [1013,25 \text{ mbar}]$, Temperatur zum Zeitpunkt der Ablesung $T_{\text{gem}} [\text{K}]$.

$$V_{\text{BG}} = \frac{(V_{\text{neu}} - V_{\text{alt}}) \times T_0 \times [(p_{\text{gem}} + p_{\text{kor}}) - p_{\text{W}}]}{p_0 \times (T_{\text{gem}} + T_0)} \quad (15)$$

Um die Biogasmenge des Probenmaterials in den Gärgefäßen zu ermitteln, wird anschließend die vom Inokulum gebildete Biogasmenge von der aus Probenmaterial und Inokulum stammenden Biogasmenge abgezogen. Dem folgend wurde die produzierte Biogasmenge in Normliter auf die zugesetzte Masse an organischer Trockensubstanz des Substrates bezogen und die für die einzelnen Zeitabschnitte berechneten spezifischen Biogaserträge $[\text{Nl/kg oTS}]$ der Probe addiert.

Spezifische Methanausbeute

In der Anfangsphase des Versuches werden die produzierten Biogaskomponenten durch die sich in der Gärtestapparatur befindlichen Luft (Kopfraum Gärgefäß und Eudiometerrohr) verdünnt. Zur Vereinheitlichung der Messungen und zur reinen Erfassung des Biogases ohne Sauerstoff bzw. Luft wurde unter der Annahme, dass Luft zu 78 % aus Stickstoff und 21 % aus Sauerstoff (Verhältnis 3,7:1) besteht, bei jeder Messung bzw. Bestimmung der Gaszusammensetzung eine Korrektur des Methangehaltes, angelehnt an die VDI-Richtlinie 4630, durchgeführt. Im Folgenden wird die Gleichung (16) zur Korrektur des Methangehaltes $CH_{4\text{kor}} [\text{Vol-}\%]$ dargestellt. Die gemessenen Volumenprozent des Methans $CH_{4\text{gem}} [\text{Vol-}\%]$, Kohlenstoffdioxids $CO_{2\text{gem}} [\text{Vol-}\%]$ und Sauerstoffs $O_{2\text{gem}} [\text{Vol-}\%]$ im Biogas dienten als Grundlage der Berechnung.

$$CH_{4\text{kor}} = \frac{CH_{4\text{gem}} \times 100}{CH_{4\text{gem}} + CO_{2\text{gem}} + (100 - [(O_{2\text{gem}} \times 3,7) + (CH_{4\text{gem}} + CO_{2\text{gem}} + O_{2\text{gem}})])} \quad (16)$$

Zur Bestimmung der Methanausbeute $[\text{Nl/kg oTS}]$ wurde die Methankonzentration $CH_{4\text{kor}} [\text{Vol-}\%]$ im Biogas mit der seit der vorhergehend durchgeführten Gasanalyse gebildeten Biogasmenge multipliziert und die Einzelwerte aufsummiert. Von der Methanausbeute des Probenmaterials war die Menge an Methan aus dem Inokulum abzuziehen, und der Wert auf die eingesetzte Menge an organischer Trockensubstanz des Substrates zu beziehen.

Zu Beginn des Versuches bestand ein wesentlicher Teil des in der Apparatur vorhandenen Gases aus Luft, welche bei der sich anschließenden Gasanalyse miterfasst wurde. Infolgedessen wurde bei der Berechnung der Methanausbeute der ersten Gasanalyse der Methangehalt im Biogas auf das tatsächlich vorhandene Biogas bezogen, in dem der Anteil an Biogas in der Gesamtmenge an Gas rechnerisch erfasst wurde. Dabei wurde wie in Gleichung (16) die Annahme, dass Luft zu 78 % aus Stickstoff und 21 % aus Sauerstoff (Verhältnis 3,7:1) besteht, zugrunde gelegt.

Statistik

In den Darstellungen der Ergebnisse sind die Mittelwerte, Standardabweichungen sowie Signifikanzen aufgeführt. Die Auswertung wurde mit Hilfe der Software *SPSS Version 15.0* sowie mit *Microsoft Excel* durchgeführt. Für den Mittelwertvergleich kam die einfaktorielle ANOVA zum Einsatz. Als Post-Hoc-Test wurde zum Vergleich mehrerer Gruppen der Dunnett-Test eingesetzt. Mittels t-Test nach Student konnten zwei zu vergleichende Gruppen auf Signifikanz geprüft werden. Korrelationsanalysen erfolgten über eine Pearson-Korrelation mittels der genannten SPSS-Software.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Chemische Zusammensetzung der Rohstoffe

4.1.1 Mais der Erntejahre 2005 und 2006

Der im Jahr 2005 geerntete Mais wurde auf eine Häcksellänge von 4 bzw. 8 mm zerkleinert und enthielt eine für die Silierung optimale Trockensubstanz von 31,85 bzw. 35,48 % in der Frischmasse (FM). Der Mais des Folgejahres enthielt 39,36 bzw. 36,07 % Trockensubstanz (TS) in der Frischmasse. Die Anteile der einzelnen Lignocellulosekomponenten der unterschiedlichen Maisvarianten sind in den Abb. 4-1, Abb. 4-2, Abb. 4-3 und Abb. 4-4 dargestellt.

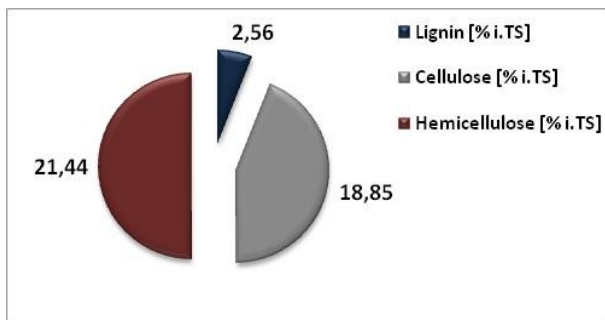


Abb. 4-1: Gemittelte Gehalte an Cellulose, Hemicellulose und Lignin im Mais des Erntejahres 2005 mit einer Häcksellänge von 4 mm

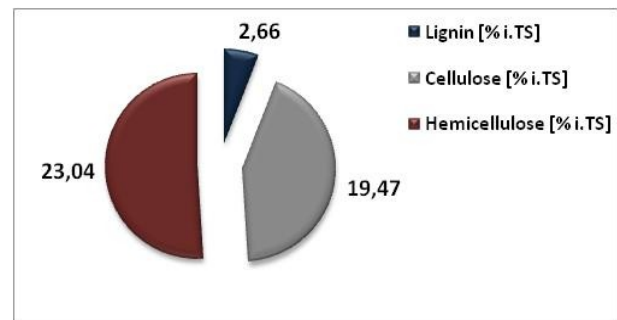


Abb. 4-2: Gemittelte Gehalte an Cellulose, Hemicellulose und Lignin im Mais des Erntejahres 2005 mit einer Häcksellänge von 8 mm

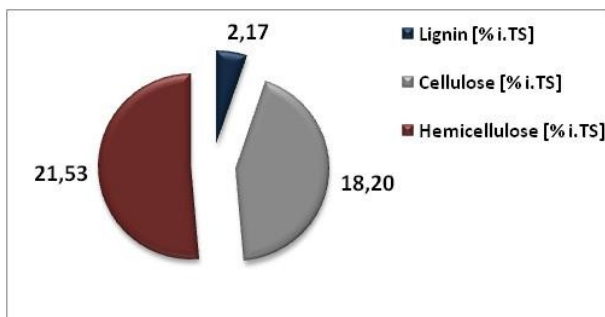


Abb. 4-3: Gemittelte Gehalte an Cellulose, Hemicellulose und Lignin im Mais des Erntejahres 2006 mit einer Häcksellänge von 4 mm

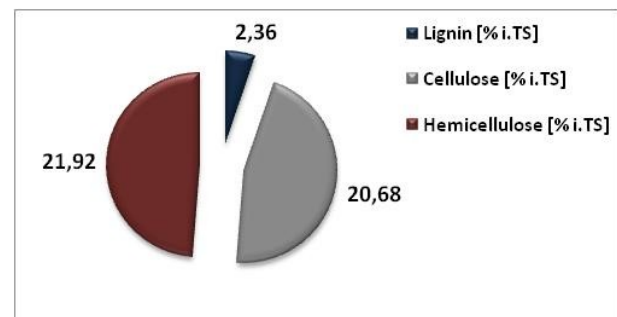


Abb. 4-4: Gemittelte Gehalte an Cellulose, Hemicellulose und Lignin im Mais des Erntejahres 2006 mit einer Häcksellänge von 8 mm

Beim Vergleich der Häcksel mit einer Länge von 4 oder 8 mm konnte ein geringer Unterschied, bezogen auf die Faserbestandteile, nachgewiesen werden. Der Anteil an Cellulose lag bei den 8 mm-Varianten höher als bei denen mit einer Häcksellänge von 4 mm. Der Gehalt an Lignocellulose - Cellulose, Hemicellulose, Lignin - lag bei den 4 bzw. 8 mm langen Häckseln bei 42,85 bzw. 45,17 % i.TS im Jahr 2005 und im Jahr 2006 bei 41,90 % i.TS bzw. 44,96 % i.TS. Untersuchungen von Zebeli *et al.* [2009] mit Maissilagen zeigten ebenfalls steigende Faserge-

halte mit zunehmender Partikellänge. Die Ergebnisse der Futtermittelanalysen¹ der Maisvarianten sind vergleichbar mit den von Kirchgeßner [1997] angegebenen Literaturwerten.

4.1.2 Roggen der Erntejahre 2006 und 2007

Der Roggen von 2006 mit 4 bzw. 8 mm Häckseln wies eine Trockensubstanz von 44,70 bzw. 43,71 % auf. Der Roggen des Jahres 2007 (8 mm) bestand aus 37,61 % Trockensubstanz und 62,39 % Wasser. Die Gehalte der Hauptbestandteile der Lignocellulose - Cellulose, Hemicellulose, Lignin - der unterschiedlichen Roggenchargen sind in den Abb. 4-5, Abb. 4-6 und Abb. 4-7 aufgeführt.

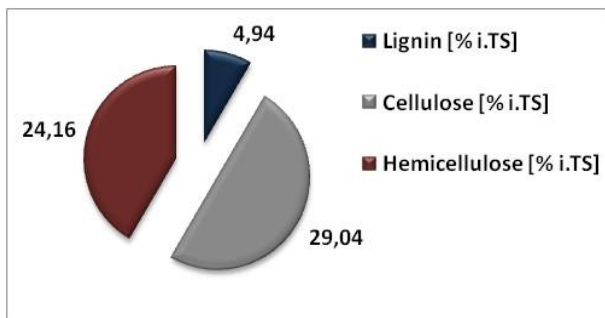


Abb. 4-5: Gemittelte Gehalte an Cellulose, Hemicellulose und Lignin im Roggen des Erntejahres 2006 mit einer Häcksellänge von 4 mm

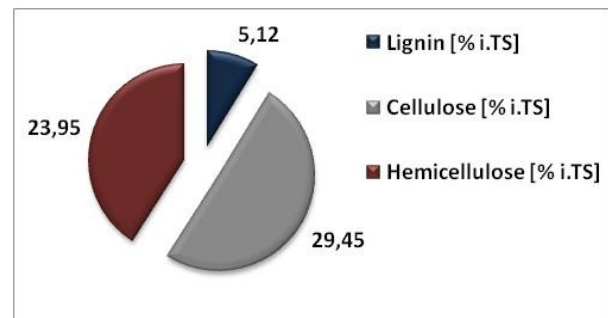


Abb. 4-6: Gemittelte Gehalte an Cellulose, Hemicellulose und Lignin im Roggen des Erntejahres 2006 mit einer Häcksellänge von 8 mm

Der Anteil an Gerüstsubstanz lag bezüglich der 4 bzw. 8 mm langen Roggenhäcksel des Jahres 2006 bei einem Mittelwert von 58,14 bzw. 58,52 % i.TS. Der Roggen mit einer Häcksellänge von 8 mm aus dem Erntejahr 2007 wies einen höheren Celluloseanteil in der Trockensubstanz von 61,93 % i.TS auf. Die Gehalte der analysierten Inhaltsstoffe¹ sind mit denen der Literatur vergleichbar.

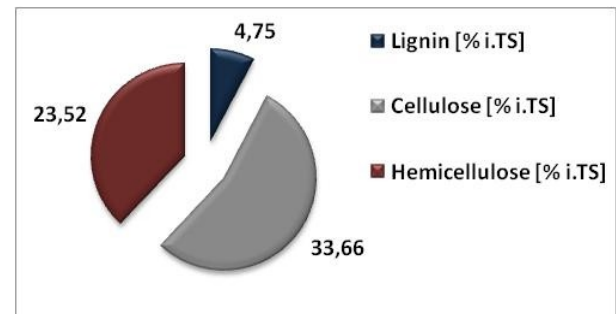


Abb. 4-7: Gemittelte Gehalte an Cellulose, Hemicellulose und Lignin im Roggen des Erntejahres 2007 mit einer Häcksellänge von 8 mm

[Zentgraf & Poutanen, 2007; Maier *et al.*, 1998; Tetlow & Mason, 1987]

Aufgrund der erfolgreichen enzymatischen Behandlung des Roggens aus dem Jahre 2006 mit einer theoretischen Häcksellänge von 8 mm (Abschnitt 4.6) wurde die Häcksellänge des Roggens von 2007 auf 8 mm festgelegt und auf eine Fraktion mit einer Länge von 4 mm verzichtet.

¹Analyseergebnisse siehe Anhang 8.2

4.1.3 Vergleich der Energiepflanzen unterschiedlicher Erntejahre

Im Hinblick auf die Trockensubstanz wiesen der Mais sowie der Roggen im Jahr 2006 einen höheren Gehalt als in den Jahren 2005 oder 2007 auf. Dies wird auf überdurchschnittlich hohe Temperaturen während der Vegetationszeit zurückgeführt. Der deutsche Wetterdienst gab folgendes für das Jahr 2006 an [Müller-Westermeier *et al.*, 2006; 2007]:

„Insgesamt war das Jahr 2006 in Deutschland warm und sehr sonnenscheinreich, während die Niederschläge etwa dem langjährigen Mittel entsprachen. Das Jahr begann mit lang anhaltender Kälte und überraschte in der 2. Jahreshälfte mit einer Vielzahl von Wärmerekorden.“

Wurden die 4 und 8 mm langen Häcksel der Maisernten verschiedener Erntejahre miteinander verglichen, konnten Unterschiede zwischen den Kohlenstoff- und Stickstoffgehalten gemessen werden. Im Jahr 2006 lagen die Werte unter denen der Rohstoffe aus dem Jahr 2005. Weitere Differenzen konnten beim Vergleich der 4 mm langen Häcksel der unterschiedlichen Beprobungsjahre nachgewiesen werden. Der Gehalt an Rohproteinen und wasserlöslichen Kohlenhydraten war im Jahr 2006 geringer als im Jahr 2005. Wurde der Rohstoff mit einer Häcksellänge von 8 mm betrachtet, waren Unterschiede in den Konzentrationen der Stickstoffverbindungen wie Nitrat und Ammonium-Stickstoff erkennbar. Höhere Werte wurden im Versuchsjahr 2006 gemessen.

Bedeutend hinsichtlich eines Vergleiches der Roggensubstrate unterschiedlicher Erntejahre waren die Differenzen in den Gehalten der Stickstoff- und Kohlenstoffverbindungen, der Faserstoffe, der wasserlöslichen Kohlenhydrate und folglich der Pufferkapazität und der Vergärbarkeit. Höhere Gehalte wurden beim Pflanzenmaterial des Jahres 2007 vorrangig bei den Faserstoffen und den Kohlenstoffverbindungen gemessen. Gegensätzlich dazu enthielt der Roggen von 2007 gegenüber dem des Jahres 2006 einen geringeren Anteil an Stickstoffverbindungen wie Rohprotein, Nitrat und Ammonium-Stickstoff sowie einen bedeutend geringeren Anteil an Kohlenhydraten.

Im Roggen des Erntejahres 2006 ließen sich sehr hohe Gehalte an wasserlöslichen Kohlenhydraten, verglichen mit denen des Roggens von 2007 und denen des Maises, nachweisen. Der hohe Kohlenhydratanteil führt zu einem hohen Vergärbarkeitskoeffizienten (S. 54) des Roggens. Sowohl der hohe Kohlenhydratanteil als auch der hohe Vergärbarkeitskoeffizient ließen den Schluss zu, dass es sich um ein leicht silierbares Material handelt. Ausgehend von den Kohlenhydratgehalten handelte es sich bei den anderen Rohstoffen - Roggen 2007, Mais 2005 und 2006 - um mittelschwer silierbare Pflanzen, da der Kohlenhydratgehalt unter 3 % lag [Kamphues

et al., 1999]. Wurde hingegen der Vergärbarkeitskoeffizient bewertet, konnte von leicht silierbaren Pflanzenrohstoffen ausgegangen werden [Schmidt *et al.*, 1971].

Zusammengefasst waren Unterschiede in den Kohlenstoffgehalten sowie den Gehalten an wasserlöslichen Kohlenhydraten und Stickstoffverbindungen auffällig.

Die Differenzen hinsichtlich der genannten Inhaltsstoffe von Mais und Roggen verschiedener Erntejahre begründen sich z. B. durch unterschiedliche Erntezeitpunkte, unterschiedliche Klima- und Witterungsbedingungen während der Ernte sowie unterschiedliche Transport- und Lagerungsbedingungen. Beispielsweise fördert eine intensive Sonnenstrahlung bei gleichzeitig nicht zu heißem Wetter die Zuckeranreicherung in den Pflanzen [Anonymus, 2012]. Der Gehalt schwankt somit in Abhängigkeit von der Tageszeit.

4.2 Aktivitäten der Lignocellulose abbauenden Enzympräparate

Anhand der Bestimmungen katalytischer Aktivitäten einzelner kommerzieller Enzympräparate wurden für Laborversuche zur Silierung sowie zur Biogasgewinnung geeignete Enzyme selektiert. Um eine Auswahl zu erzielen, kamen verschiedene Modellsubstrate zur Anwendung (Abschnitt 3.2.2). Anhand des Grades der Konversion der eingesetzten Modellsubstrate unter Anwendung bestimmter Enzymkonzentrationen konnte ein Vergleich der Präparate erreicht werden. Die eingesetzten Enzympräparate sind im Abschnitt 3.2.3 charakterisiert. Die Ergebnisse² der hydrolytisch wirkenden Enzympräparate sind im Folgenden grafisch dargestellt.

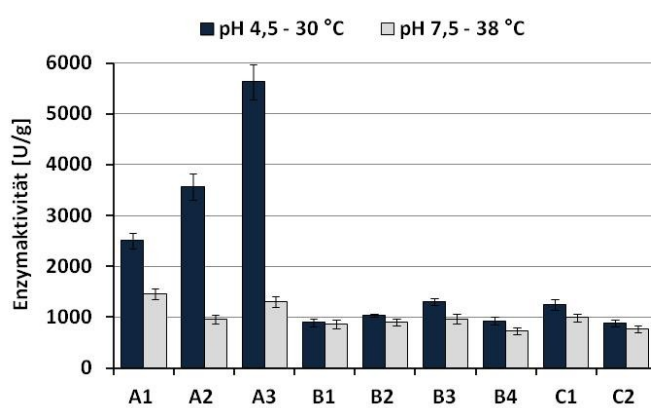


Abb. 4-8: Cellulolytische Aktivitäten der Enzympräparate gegenüber Natrium-Carboxymethylcellulose

Die eingesetzten Cellulasen wiesen erwartungsgemäß unter Silierbedingungen, bei einem pH-Wert von 4,5 und einer Temperatur von 30 °C, die höchsten Aktivitäten bezüglich der Natrium-Carboxymethylcellulose (Na-CMC) auf (Abb. 4-8). Die Cellulase A3 der *Acremonium sp.* zeigte die höchste Aktivität. Bei den nicht als Cellulase ausgewiesenen Präparaten konnten ebenfalls cellulolytische

Aktivitäten nachgewiesen werden. Es ist bereits bekannt, dass Na-CMC auch durch als Pektinase oder Hemicellulase deklarierte Enzympräparate aufgrund von cellulolytischen Nebenaktivitäten abbaubar ist [Schalow, 2008]. Wurde unter Biogasreaktorbedingungen inkubiert, das heißt bei

²Analyseergebnisse siehe Anhang 8.6

einem pH-Wert von 7,5 und einer Temperatur von 38 °C, nahmen die Aktivitäten aller Präparate wie zu erwarten ab und näherten sich an, da die pH-Optima der Enzyme im Bereich von 4 bis 5 liegen. Im Bereich höherer pH-Werte sind diese weniger aktiv. Dies bestätigen Versuche von Kim und Lee [2009], wobei lignocellulosisches Material sowohl unter sauren als auch methanogenen Bedingungen hydrolysiert wurde. Die Akkumulationsraten ausgewählter Kohlenhydrate wie Glucose und Xylose waren unter sauren Bedingungen höher als unter methanogenen. Das pH-Optimum der Cellulase A1 lag über und das Temperatur-Optimum unter den Optima der zusätzlich untersuchten Präparate (Abschnitt 3.2.3), wodurch bei diesem Präparat die höchsten Enzymaktivitäten bei einem pH-Wert von 7,5 und einer Temperatur von 38 °C gemessen werden konnten.

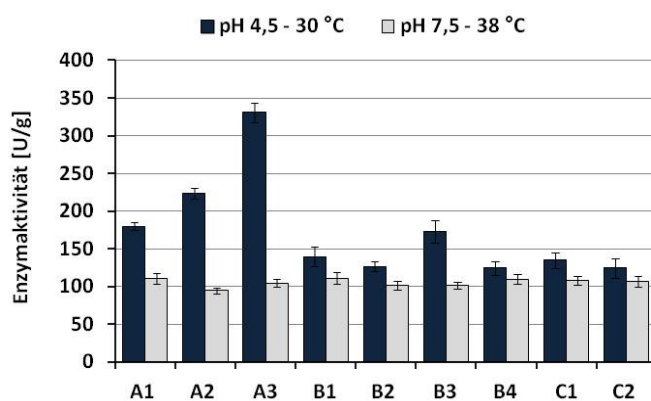


Abb. 4-9: Cellulolytische Aktivitäten der Enzympräparate gegenüber Filterpapier

Ein ähnliches Verteilungsmuster wie bei den Aktivitätsmessungen bezüglich des Modells substrates Na-CMC wurde am Filterpapiers (FP) als Substrat nachgewiesen (Abb. 4-9). Es wurden jedoch geringere Enzymaktivitäten, verglichen mit den Ergebnissen bezüglich der Na-CMC, gemessen. Das experimentelle Ergebnis ist auf die Heterogenität des Filterpapiers, welches amorphe sowie kristalline

Cellulosebereiche enthält, zurückzuführen. Auch hier zeigte sich das Enzym A3 als das Präparat mit der höchsten Enzymaktivität bei der Inkubation unter Silierbedingungen. Unter den Bedingungen einer Biogasproduktion konnte die höchste Aktivität bei der Cellulase A1 bzw. der Pektinase B1 gemessen werden.

In der Abb. 4-10 wird deutlich, dass die in dieser Arbeit eingesetzten Präparate in der Lage sind, Pektin (P) aufgrund von pektinolytischen Haupt- oder Nebenaktivitäten abzubauen. Enzym A3 wies sowohl unter Silier- als auch unter Biogasreaktorbedingungen die höchsten Aktivitäten auf. Da dieses Enzym als Cellulase vom Hersteller geführt wird, ist anzunehmen, dass es eine pektinolytische Begleitaktivität besitzt. Desweiteren wurden gegenüber den untersuchten Präparaten höhere Aktivitäten bei der Anwendung der Pektinasen B1 und B4 unter Silierbedingungen gemessen. Unter Biogasreaktorbedingungen glichen sich die Aktivitäten der Enzympräparate, ausgenommen Cellulase A3 und A1, an.

Die Enzympräparate besitzen gemäß den Herstellerangaben ausgewiesene xylanolytische oder hemicellulolytische Begleitaktivitäten. Dies konnte im Rahmen der Untersuchungen belegt werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen mittels Modellsubstraten aufgeführt, welche die in den Pflanzen am häufigsten vorkommenden Bestandteile der Hemicellulose darstellen sollen. Dazu zählen die Polyosen Arabinogalactan, Glucomannan und Arabinoxylan [Gruber, 2005a].

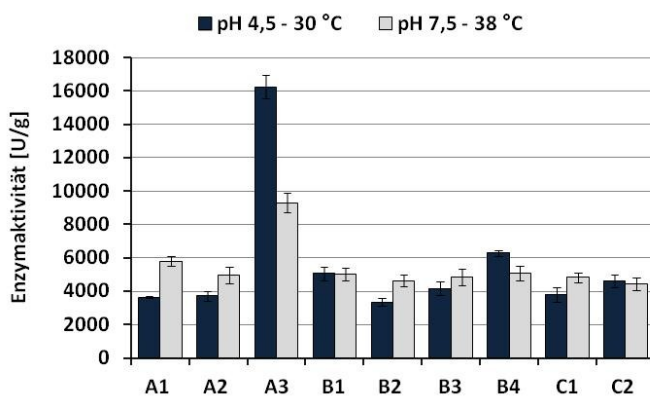


Abb. 4-10: Pektinolytische Aktivitäten der Enzympräparate gegenüber Pektin

Das Enzympräparat B2, welches als Hemicellulase gehandelt wird, zeigte, unerwartet geringere Aktivitäten gegenüber den vorhergehend genannten Cellulasen und Pektinasen, welche xylanolytische bzw. hemicellulolytische Begleitaktivitäten aufwiesen. Den Untersuchungen mit Arabinogalactan gleichend, wiesen auch beim Einsatz des Modellsubstrates Glucomannan (GM) die Cellulasen A2 und A3 die höchsten Enzymaktivitäten unter Silierbedingungen auf (Abb. 4-12).

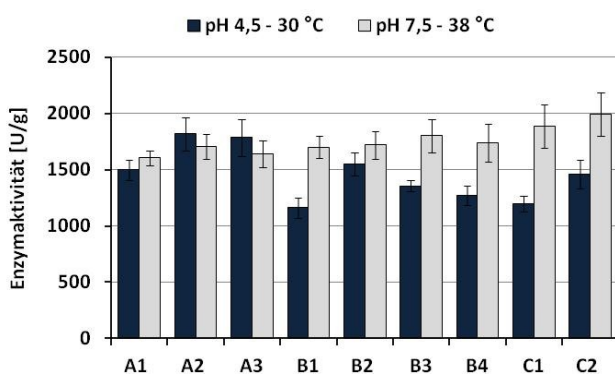


Abb. 4-11: Hemicellulolytische Aktivitäten der Enzympräparate gegenüber Arabinogalactan

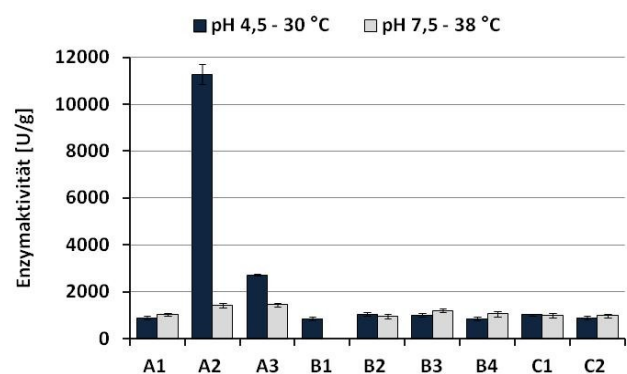


Abb. 4-12: Hemicellulolytische Aktivitäten der Enzympräparate gegenüber Glucomannan

Die hemicellulolytischen Begleitaktivitäten der Cellulase A2 und A3 wirkten auch in den Versuchen unter Biogasreaktorbedingungen am effektivsten. Unter Bedingungen einer Biogasproduktion nahmen die Aktivitäten der Cellulasen A2 und A3 wie bei den Untersuchungen mit Arabinogalactan konträr zu den Aktivitäten der anderen Präparate ab.

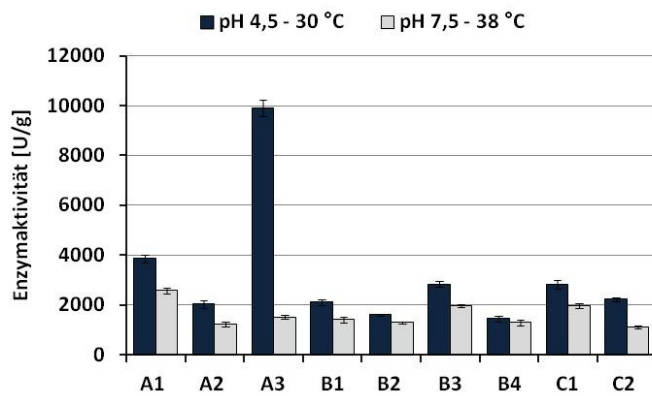


Abb. 4-13: Hemicellulolytische Aktivitäten der Enzympräparate gegenüber Arabinoxylan

Bei der Anwendung von Pektinase B1 waren keine Aktivitäten unter den Versuchsbedingungen einer Biogasproduktion messbar. Die Messungen der Enzymaktivitäten der Präparate mittels des Modellsubstrates Arabinoxylan (AX) zeigten (Abb. 4-13), dass das Enzym A3 unter Silierbedingungen die höchste Aktivität aufwies. Wurde der pH-Wert auf 7,5 und die Temperatur auf 38 °C gesteigert, konnte der Einfluss der Milieubedingungen auf die Enzymaktivitäten in Form eines Angleichens der Aktivitäten gemessen werden. Unter diesen Bedingungen zeigte Enzym A1 die höchsten Aktivitäten. Hohe Aktivitäten wiesen ebenfalls die nicht als Hemicellulase sondern Cellulase ausgewiesenen Präparate A1, B3 und C1 auf. Hemicellulase B2 zeigte eine geringe Wirkung gegenüber Arabinoxylan.

Die Abb. 4-14 zeigt den Vergleich der eingesetzten Laccasen unter Anwendung oxidierbarer Modellssubstrate. Aufgrund der unterschiedlichen mikrobiellen Herkunft zeigten die eingesetzten Laccasen unterschiedliche Wirkungen gegenüber den Modellsubstraten Guaiacol und 2,6-Dimethoxyphenol. Die Abbildung verdeutlicht, dass Laccase C gegenüber den angewendeten Substraten aktiver ist als Laccase A.

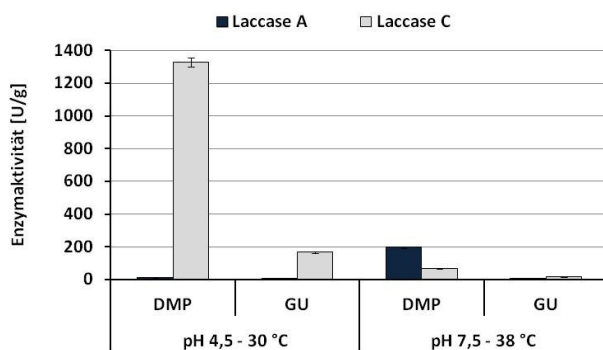


Abb. 4-14: Oxidative Aktivitäten der Laccasen gegenüber 2,6-Dimethoxyphenol (DMP) und Guaiacol (GU)

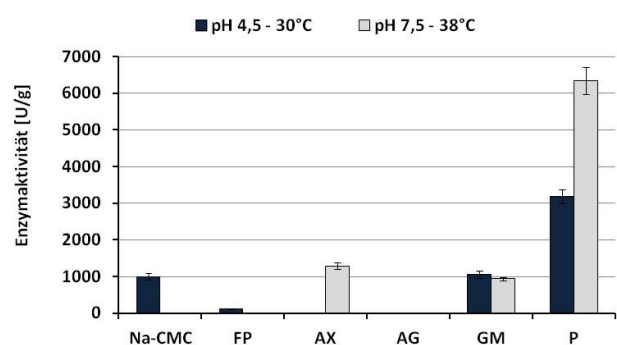


Abb. 4-15: Begleitaktivitäten der Laccase C gegenüber Natrium-Carboxymethylcellulose (Na-CMC), Filterpapier (FP), Arabinoxylan (AX), Arabinogalactan (AG), Glucomannan (GM) und Pektin (P)

Laccase C weist darüber hinaus eine bessere Lagerstabilität auf, wurde demzufolge in fort-führenden Versuchen eingesetzt und ein ausgewähltes Spektrum an Begleitaktivitäten gemessen (Abb. 4-15). Bei einem pH-Wert von 4,5 und einer Temperatur von 30 °C konnten Aktivitäten

gegenüber den Modellsubstraten Na-CMC, FP, GM und P gemessen werden. Wurde unter Bedingungen einer Biogasproduktion gemessen, zeigte sich ein anderes Spektrum an Begleitaktivitäten. Messbar waren Aktivitäten gegenüber Arabinoxylan, Glucomannan und Pektin. Vor allem hinsichtlich der cellulolytischen und hemicellulolytischen Begleitflora sind deutliche Unterschiede im Vergleich zum Einsatz von Laccase C unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen messbar. Unter Anwendung von Arabinogalactan konnten keine Aktivitäten nachgewiesen werden.

4.3 Auswahl von Enzymen

Zur Behandlung von Lignocellulose während der Silierung, direkt vor dem Biogasprozess sowie während des Biogasprozesses waren geeignete kommerzielle Enzympräparate zu wählen. Basierend auf den Messungen der Enzymaktivitäten bei standardisierten Bedingungen (Abschnitt 4.2) war eine Auswahl möglich.

Das Ziel der Untersuchungen ist ein nahezu vollständiger Abbau der Lignocellulose, daher wurden nicht nur Einzelpräparate, sondern auch Präparate in Mischung eingesetzt.

Für den Einsatz während der Silierung wurden folgende Enzympräparate ausgewählt: **A3**, **B4** und **Laccase C**. Cellulase A3 wies gegenüber einem Großteil an Modellsubstraten die höchsten Aktivitäten unter Silierbedingungen auf. Dem Abschnitt 4.2 kann entnommen werden, dass die Pektinase B4, verglichen mit den Pektinasen B1 und C2, die höchste Aktivität bei der Inkubation mit Pektin aufwies. Laccase C zeigte die höchsten Aktivitäten beim Vergleich der Laccasen und war daher für die genannten Anwendungen zu präferieren.

Bei der enzymatischen Behandlung der Silagen direkt vor dem Biogasprozess kam eine Mischung von Cellulase **A3** und Pektinase **B4** aus den oben genannten Gründen zur Anwendung. Eine Laccase wurde nicht eingesetzt.

Zur Unterstützung der Hydrolysen während des Biogasprozesses waren die Präparate **A1** und **B1** sowie zur Oxidation einzelner Ligninfragmente **Laccase C** einzusetzen. Die cellulolytischen und xylanolytischen Aktivitäten der Cellulase A1 lagen bei den Enzymassays unter Bedingungen einer Biogasproduktion über denen der zusätzlich untersuchten Präparate. Pektinase B1 erzielte neben hohen pektinolytischen Aktivitäten auch hohe Aktivitäten gegenüber Arabinoxylan und verschiedenen Cellulosen. Wie im vorhergehenden Abschnitt bereits beschrieben, war aufgrund der enzymatischen Aktivität die Laccase C beim Vergleich der Oxidoreduktasen und aufgrund der besseren Lagerstabilität, verglichen mit Laccase A, in anschließenden Versuchen zu verwenden.

Mais des Erntejahres 2005 wurde mit den Enzymen **B3** und **B4** versetzt. Der Grund hierfür liegt in der Abhängigkeit der Arbeiten von den Erntezeiten; zum Zeitpunkt der Ernte im Jahr 2005 waren die Arbeiten bezüglich der Auswahl von Enzymen mit Hilfe von Enzymaktivitätsbestimmungen nicht weit genug für eine Selektion von Enzymen fortgeschritten.

Neben den Enzymaktivitäten waren die pH- und Temperaturoptima der Präparate (S. 37) ausschlaggebend.

4.4 Methodik der Enzymzugabe

4.4.1 Enzymatische Behandlung der Rohstoffe während der Silierung



Abb. 4-16: Enzymapplikation vor der Einsilierung des Rohstoffes

In einem ersten Schritt wurden ausgewählte Enzympräparate den Rohstoffen vor der Silierung zugesetzt, sodass diese während der Konservierung der Rohstoffe bei optimalen pH-Werten wirken konnten. Die Umsetzung gelang über das Aufsprühen des in Wasser gelösten Enzyms auf die vorher durchmischten Rohstoffhäcksel (Abb. 4-16). Es wurden 10 ml einer Enzymlösung, welche ein einzelnes Enzympräparat oder ein Gemisch aus Enzympräparaten enthielt, mit einer Konzentration je Enzympräparat von 0,07 g/kg Mais oder Roggen appliziert. Anschließend wurde das Pflanzen-

material in ein 1,5 l Weckglas einsiliert (S. 72) und für 365 Tage konserviert und gelagert. Zur Applikation wurden Sprühgeräte der Firma ABC-GmbH (COTEC® Handreinigungsspray) genutzt. Die detaillierte Enzymdotierung der Rohstoffe Mais und Roggen ist in der Tab. 4-1 wiedergegeben.

Die vor der Enzymzugabe ermittelten Konzentrationen der bei der Maissilage von 2005 eingesetzten Enzympräparate lagen, bedingt durch differierende Berechnungsgrundlagen, weitaus höher als bei den Silagen der Jahre 2006 und 2007. Als Basis für die Berechnungen dienten die Dosierungsempfehlung von Herstellern der Fruchtverarbeitungsindustrie und der Anteil an Faserstoffen in den Rohstoffen. Empfohlen wurden 32 ml Cellulase bzw. 25 ml Pektinase pro 1 kg Apfelfasern. Ausgehend von 125 g Fasern in einem Kilo Maishäcksel, lag die Dosierung demnach bei 4 ml Enzym B3 bzw. 3,1 ml Enzym B4 pro Kilogramm Substrat.

Tab. 4-1: Enzymbelegung von Mais und Roggen unterschiedlicher Erntejahre und Häcksellängen vor der Silierung

Häcksellänge	n	Mais 2005	n	Roggen 2006	n	Mais 2006	n	Roggen 2007
4 mm	6	B3	8	A3/B4	6	A3/B4		
	6	B4	8	A3/L	6	A3/L		
	6	B3/B4	8	B4/L	6	B4/L		
Kontrolle ¹	56		8		25			
8 mm	6	B3	8	A3	6	A3	6	B4/L-1
	6	B4	8	B4	6	B4	6	A3/B4-1
	6	B3/B4	8	L	6	L	6	A3/B4/L-1
			8	A3/B4	6	A3/B4	6	B4/L-2
			8	A3/L	6	A3/L	6	A3/B4-2
			8	B4/L	6	B4/L	6	A3/B4/L-2
			8	A3/B4/L	6	A3/B4/L		
Kontrolle ¹	56	-	8	-	45	-	15	-

A3 = Cellulase, B3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase, n = Probenanzahl (Weckgläser), ¹Kontrolle = Probe ohne Enzymzusatz, Enzym-1 = 0,07 g Enzym/kg Roggen, Enzym-2 = 0,14 g Enzym/kg Roggen

Bei der Roggensilage von 2007 wurde mit zwei verschiedenen Enzymkonzentrationen gearbeitet. Zum einen kam die gleiche Konzentration an Enzympräparat wie bei der Mais- und Roggensilage von 2006 zum Einsatz (Kennzeichnung: Enzym-1), um die Reproduzierbarkeit der Silageproduktion mit und ohne Enzymzusatz zu prüfen. Und zum anderen wurde eine zweifach so hohe Dosierung von 0,14 g Enzym/kg an Mais oder Roggen gewählt (Kennzeichnung: Enzym-2), um den Effekt einer Konzentrationsveränderung des Enzyms zu analysieren.

Aufbauend auf den Ergebnissen bezüglich der Methanausbeuten der Maissilagen von 2005 wurden bei den darauffolgend hergestellten Silagen mit einer Häcksellänge von 4 mm keine Einzelpräparate eingesetzt. Die Untersuchungen mittels Maissilage (2005) zeigten hinsichtlich der Methanausbeuten Mindererträge bei der Vorbehandlung mittels einzelnen Enzympräparaten unter Anwendung von 4 mm langen Partikeln.

Die Auswahl der eingesetzten Enzymmischungen bei der Roggensilage 2007 begründet sich durch die erzielten Ergebnisse mittels der Roggensilage von 2006. Es wurden jeweils aussichtsreiche Varianten gewählt, welche positive Wirkungen hinsichtlich der Biogas- und Methanausbeuten zeigten.

Vor sowie nach der Behandlung mit Enzymen wurde das Material auf ausgewählte Inhaltsstoffe untersucht (Abschnitt 3.3.2). Während des gesamten Zeitraumes der enzymatischen Behandlung wurde weiterhin der Massenverlust der einzelnen Varianten bestimmt und nach 90 sowie 365 Tagen der Konservierung und Lagerung die Silagequalität (Abschnitt 3.3.3) ermittelt. Nach einer Konservierungszeit von 90 Tagen wurden die Silagen auf ihr Biogas- und Methanbildungs-

potenzial hin untersucht (Abschnitt 3.3.5). Abschließend konnten die Abbaugrade der Faserstoffe während der Silierung sowie der Methanisierung bestimmt werden (Abschnitt 3.3.4).

4.4.2 Enzymatische Behandlung der Silagen direkt vor dem Biogasprozess

Als Grundlage der Untersuchungsmethodik dienten die Versuchsanweisungen von Wang *et al.* [2002]. Diese beschreiben die enzymatische Behandlung von Futtermitteln zur Ermittlung der Effekte von exogenen faserspaltenden Enzymen auf die epiphytischen mikrobiellen Populationen und die *in vitro* Verdauung von Gerste- und Maissilagen.

Zur 24-stündigen enzymatischen Behandlung der Roggensilage von 2007 mit einer Häcksellänge von 8 mm direkt vor dem Biogasprozess wurde die Enzymmischung A3/B4 in einer Konzentration von 0,35 g/kg der Silage eingesetzt. Grund für den Einsatz von A3/B4 waren die ermittelten Methanausbeuten beim Einsatz von Cellulase und Pektinase (A3/B4) bei den Silagen der Jahre 2006 und 2007. Die angeführte Mischung (10 ml) war auf die Probe zu sprühen, wie in Abschnitt 4.4.1 aufgeführt, und für 24 Stunden bei Raumtemperatur in ein Weckglas zur semi-anaeroben Vorbehandlung zu geben.

Neben dem Zusatz eines Enzympräparates wurde ein Wasserzusatz (1:1; je 350 g) für 24 h als Behandlungsvariante geprüft. Das Wasser wurde zur Silage mit und ohne Enzym in ein Weckglas gegeben.

Tab. 4-2: Enzymebelegung von Roggen des Erntejahres 2007 mit einer Häcksellänge von 8 mm nach der Silierung

Häcksellänge	n	Roggensilage 2007
8 mm	2	P
	2	W
	2	E
	2	P/W
	2	P/E
	2	W/E
	2	P/W/E
Kontrolle ¹	2	-

P = Pasteurisieren: 90 °C, 1 bar, 20 Minuten; E = Enzym: A3 + B4, 1 kg je Enzym/t TS Roggen; W = Wasser: 350 g Silage + 350 g Wasser; n = Probenanzahl (Weckgläser), ¹Kontrolle = Probe ohne Enzymzusatz

Weiterhin wurden pasteurisierte Varianten mit und ohne Wasser sowie Enzym hergestellt, um mikrobielle Stoffwechselvorgänge zu unterdrücken, wodurch die katalysierten, biochemischen Reaktionen des zugesetzten Enzympräparates gemessen und mikrobielle Umsetzungen der Reaktionsprodukte vermieden werden konnten. Das Pasteurisieren fand bei einer Temperatur von 90 °C und einem Druck von 1 bar für 20 Minuten statt. Die einzelnen Varianten können der Tab. 4-2 entnommen werden. Den Ansätzen wurden

nach 24 Stunden Proben entnommen und diese auf den Gehalt an reduzierenden Kohlenhydraten und flüchtigen Bestandteilen sowie auf den pH-Wert untersucht. Ebenso erfolgte eine Bestimmung des Biogas- und Methanbildungspotenziales (Abschnitt 3.3.5), eine Futtermittelanalyse (Abschnitt 3.3.2) sowie eine abschließende Berechnung der Abbaugrade ausgewählter

Inhaltsstoffe bezüglich der 24-stündigen Behandlung und der nachfolgenden Methanisierung (Abschnitt 3.3.4).

4.4.3 Enzymatische Behandlung der Silagen während des Biogasprozesses

In einem letzten Schritt wurden ausgewählte Enzympräparate dem Biogasprozess direkt zugesetzt. Die einzelnen Varianten sind in der Tab. 4-3 dargestellt.

Tab. 4-3: Enzymebelegung von Mais- und Roggensilagen des Erntejahres 2006 mit variierenden Häcksellängen während des Biogasprozesses

Häcksellänge	n	Maissilage 2006	n	Roggensilage 2006
4 mm	3	A1/B1	3	A1/B1
	3	A1/L	3	A1/L
	3	B1/L	3	B1/L
Kontrolle ¹	3		3	
8 mm	3	A1	3	A1
	3	B1	3	B1
	3	L	3	L
	3	A1/B1	3	A1/B1
	3	A1/L	3	A1/L
	3	B1/L	3	B1/L
	3	A1/B1/L	3	A1/B1/L
Kontrolle ¹	3	-	3	-

A1 = Cellulase, B1 = Pektinase, L = Laccase, n = Probenanzahl (Eudiometerrohre), ¹Kontrolle = Probe ohne Enzymzusatz

Nach der Einwaage der Silagen in die Gärgefäße wurde 1 ml der Enzymlösung mittels Pipette auf das Substrat gegeben. Die Konzentration der Enzyme lag bei 0,07 g/kg siliierter Energiepflanze. Im Anschluss wurde das Inokulum hinzugefügt.

Vor sowie nach dem Vergären des Gemisches aus Substrat, Enzympräparat und Inokulum im Batch-Gärtest (Abschnitt 3.3.5) wurden die Konzentrationen ausgesuchter Inhaltsstoffe (Abschnitt 3.3.2) bestimmt und dem folgend die Abbaugrade (Abschnitt 3.3.4) ermittelt.

4.5 Silierung der Rohstoffe Mais und Roggen

4.5.1 Aufbereitung der Energiepflanzen

Zur Konservierung der Rohstoffe Mais und Roggen wurde der natürliche Gärprozess genutzt. Typisch ist ein unter anaeroben Bedingungen ablaufender Stoffwechsel von Mikroorganismen, vornehmlich Milchsäurebakterien.



Abb. 4-17: Einsilieren der Rohstoffe

Dazu wurde der Rohstoff einem Mischverfahren unterzogen, abgewogen, in Weckgläsern verdichtet und anaerob verschlossen. Bei den Varianten mit Enzymzusatz wurden die Enzympräparate nach der Einwaage der Rohstoffe auf den Rohstoff gesprüht, der Rohstoff gemischt und wie in Abb. 4-17 dargestellt, in Gläser einsiliert. Die für jede Silage verwendeten Einwaagen und Silierbedingungen sind in der Tab. 4-4 zusammengefasst.

Tab. 4-4: Erntezeitpunkt und Einwaage der Rohstoffe, Enzymkonzentrationen in den Silagen sowie Silierbedingungen

	Ernte	Rohstoffeinwaage [g/1,5 l Weckglas]	Enzym [g/Rohstoffeinwaage]	Siliertemperatur
Maissilage 2005	14.10.2005			
4 mm		920	B3: 3,7/B4: 2,9	-
8 mm		810	B3: 3,2/B4: 2,5	
Roggensilage 2006	28.06.2006			
4 mm		614	A3/B4/L: 0,043	25 °C ± 4 °C
8 mm		661	A3/B4/L: 0,046	
Maissilage 2006	21.09.2006			
4 mm		920	A3/B4/L: 0,064	23 °C ± 2,5 °C
8 mm		862	A3/B4/L: 0,060	
Roggensilage 2007	15.06.2007			
8 mm		781	A3/B4/L: 0,055 A3/B4/L: 0,11	25 °C ± 6 °C

A3 = Cellulase, B3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase

4.5.2 Chemische Zusammensetzung der Silagen

4.5.2.1 Maissilage der Erntejahre 2005 und 2006

Die Trockensubstanzgehalte der Maissilagen des Jahres 2005 und 2006 sind im Vergleich mit den Werten der nicht silierten Erntegüter in der Abb. 4-18 aufgeführt. Die Trockensubstanzgehalte der Maissilagen von 2005 fielen höher als die der Rohstoffe aus. Ähnliche Ergebnisse zeigten die Untersuchungen von Zebeli *et al.* [2009] mit Mais verschiedener Häcksellängen. Die stofflichen Veränderungen der Rohstoffe dieser Arbeit während der Silierung werden im Abschnitt 4.5.3 bis 4.5.5 diskutiert.

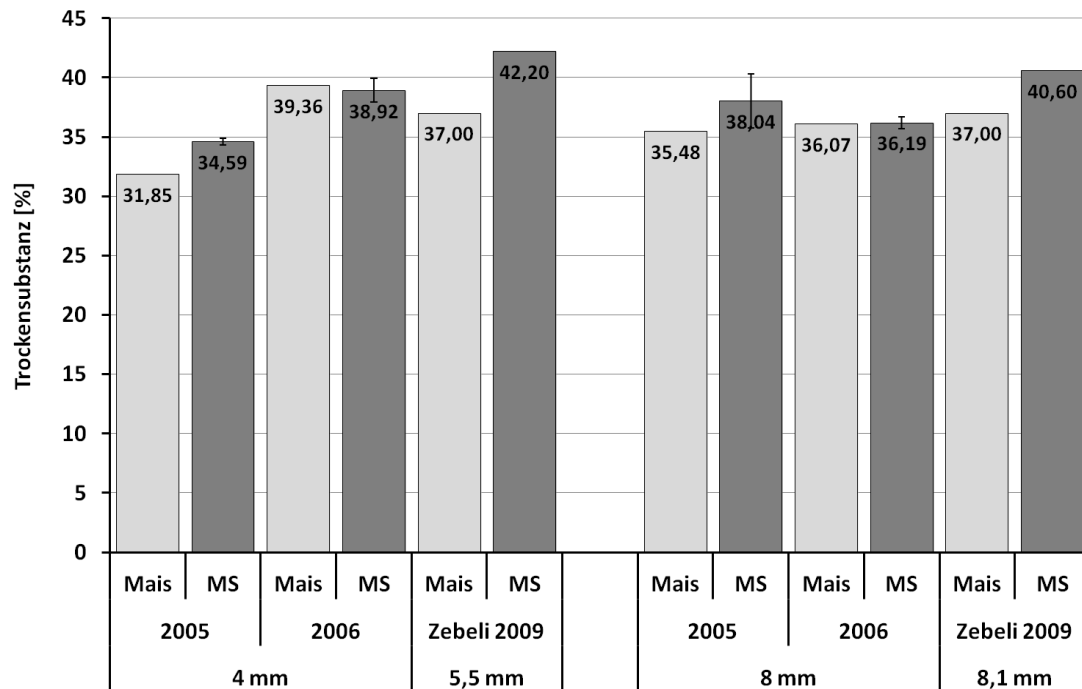


Abb. 4-18: Gemittelte Trockensubstanzgehalte von Mais und Maissilagen unterschiedlicher Erntejahre und Häcksellängen im Vergleich mit Literaturwerten (MS = Maissilage)

Der Gehalt an Lignocellulose lag im Erntejahr 2005 unter Anwendung von 4 bzw. 8 mm Häckseln bei 45,20 bzw. 47,77 % i.TS. Im Jahr 2006 lagen die Werte bei 43,89 % i.TS bzw. 43,19 % i.TS. Der Abbau der einzelnen Bestandteile von Lignocellulose während der Silierung wird in Abschnitt 4.5.4 diskutiert. Die Ergebnisse der Futtermittelanalysen³ entsprachen den von Filya [2004] aufgeführten Daten von Silomais.

Die Maissilage von 2005 wies eine Summe an flüchtigen Fettsäuren (Gesamtsäure (GS) = Milchsäure, Essigsäure, Propionsäure, iso-Buttersäure, n-Buttersäure, iso-Valeriansäure, n-Valeriansäure, n-Caprinsäure) bei den Varianten mit 4 mm bzw. 8 mm Länge von 2,16 bzw. 2,29 % auf. Die Summe an Säuren umfasst hauptsächlich Milch- und Essigsäure. Propionsäure wurde bei den 4 sowie 8 mm Häckseln in geringer Menge von 0,04 % nachgewiesen. Dies deutet auf eine bakterielle Propionsäuregärung des epiphytischen Keimbefalles, unter Umsetzung von Milchsäure, während der Silierung hin. Propionsäure-bildende Organismen sind z. B. *Propionibacterium* und *Clostridium propionicum* [Schlegel & Fuchs, 2007]. Bei dem Rohstoff mit einer Häcksellänge von 4 mm konnte zusätzlich 3-Methylbuttersäure (iso-Valeriansäure) in Spuren von 0,004 % nachgewiesen werden. Proteolytische Clostridien erzeugen durch den Katabolismus von Aminosäuren eine Vielzahl an flüchtigen Fettsäuren. Aus Leucin wird über die Stickland-Reaktion unter Abspaltung von Wasserstoff 3-Methylbuttersäure gebildet [Oude

³Analyseergebnisse siehe Anhang 8.2

Elferink *et al.*, 2001]. Thaysen [2010] stellte dar, dass mit sinkendem Gehalt an Trockensubstanz die Buttersäurekonzentration zunimmt. Maissilage des Ernejahres 2005 mit 4 mm Häckseln wies den geringsten Gehalt an Trockensubstanz und als einzige Variante Buttersäure auf.

1,2-Propandiol war in geringen Mengen von 0,08 % Bestandteil der Silage mit einer Häcksel­länge von 4 mm. Moleküle wie Essigsäure und 1,2-Propandiol können bei der anaeroben Um­setzung von Milchsäure durch verschiedene Milchsäurebakterien wie *Lactobacillus buchneri* unter sauren Bedingungen entstehen.

Bei der Silage des Jahres 2005 mit einer Häcksel­länge von 8 mm konnten Spuren von n-Propanol in Höhe von 0,009 % detektiert werden. n-Propanol ist ein Produkt aus der Konver­sion von Propionsäure oder Propionaldehyd des Bakteriums *Clostridium acetobutylicum* [Blanchard & MacDonald, 1935] oder ein Produkt des anaeroben Abbaus von 1,2-Propandiol [Oude Elferink *et al.*, 2001]. Auch Hefen vermögen aus Aminosäuren durch Desaminierung und Decarboxylierung Alkohole wie n-Propanol zu bilden [Neumann, 2007].

Auf der einen Seite erklären die in den einzelnen genannten Säuregärungen entstandenen Alko­hole den höheren Alkoholgehalt (Gesamtalkohol (GA) = Ethanol, Aceton, Methanol, n-Propanol, 1,2-Propandiol, 2,3-Butandiol, iso-Propanol, 2-Butanol, 1-Butanol) von 0,30 % bei den Mais­häckseln mit einer Länge von 4 mm gegenüber denen mit einer Länge von 8 mm (0,15 %). Auf der anderen Seite wird angenommen, dass heterofermentative Milchsäurebakterien, vor allem *Leuconostocarten*, neben Milchsäure Ethanol produzierten [Schlegel & Fuch, 2007]. Weiterhin sind alkoholische Gärungen unter Ethanolbildung von Hefen denkbar. Hefen sind Bestandteil der natürlichen Mikroflora auf Silagegütern. Typische, in Silagen vorkommende Hefen wie *Pichia fermentans*, *Candida krusei* und *Rhodotorula mucilaginosa* sind in der Lage, wasserlösliche Kohlenhydrate („Feldhefen“) und/oder flüchtige Fettsäuren wie Milchsäure („Silagehefen“) zu verstoffwechseln. [Pahlow, 2001]

Die Maissilage des Jahres 2006 mit einer Länge von 4 bzw. 8 mm enthielt einen Säureanteil von 2,35 % bzw. 2,27 %, wobei der Anteil an Milchsäure höher und der Anteil an Essigsäure geringer ausfiel als bei der Silage von 2005. Dies kann auf einen unterschiedlichen Besatz an epiphytischen Mikroorganismen und demnach unterschiedlichen Gärungsmustern während der Silierung zurückgeführt werden. Propion- und Buttersäure waren in der Maissilage von 2006 nicht detektierbar. Die Verhältnisse von Essig- zu Milchsäure können bei den Maissilagen von 2005 bzw. 2006 mit 1:3 bzw. 1:5 definiert werden. Das Verhältnis sollte bei 1:3 liegen, engere Verhältnisse wären Hinweise für eine unzureichende Verdichtung und zu viel Restluft [Gries,

2008]. Bei Verhältnissen von 1:4 oder 1:5 geht man von einer rein homofermentativen Milchsäuregärung aus [Becker, 2003].

Die Untersuchungsergebnisse von Calabro *et al.* [2005] zeigten bezüglich der Parameter Milchsäure und Essigsäure Analysenwerte von 1,86 bzw. 0,68 %, welche mit denen dieser Arbeit vergleichbar sind. Durchgeführt wurden die Arbeiten von Calabro *et al.* mit einer Maissilage, welche 38,5 % Trockensubstanz in der Frischmasse enthielt.

Alkohole konnten in ähnlichen Größenordnungen wie bei der Maissilage von 2005 nachgewiesen werden. Es wurden Werte von 0,22 bzw. 0,33 % bei den 4 bzw. 8 mm Häckseln analysiert. Konträr zur Maissilage von 2005 wurden keine Fehlgärungen wie Buttersäure- oder Propionsäuregärung nachgewiesen. Demzufolge ist die Bildung des Ethanols auf heterofermentative Milchsäurebakterien oder Hefen in der Silage zurückzuführen. Neben Ethanol wurde n-Propanol gebildet, was auf eine alkoholische Gärung durch Hefen hinweist. Die Gehalte an Hefen in den einzelnen Varianten werden im Abschnitt 4.5.5 veranschaulicht.

Der Gehalt an Ammoniak (NH_3) belief sich bei den untersuchten Silagen der Jahre 2005 bzw. 2006 auf 0,04 bzw. 0,03 %. Calabro *et al.* [2005] wiesen Werte gleicher Höhe von 0,03 % Ammoniak in der Frischmasse nach. Ammoniak entsteht beim proteolytischen Abbau von Eiweißen oder freien Aminosäuren durch Clostridien wie *C. bifermentans* und *C. sporogens*, zumeist über die Stickland-Gärung oder eine Desaminierung. Weitere Produkte der Stickland-Gärung sind flüchtige Fettsäuren und Kohlendioxid. Die gemessene iso-Valeriansäure bei der Maissilage von 2005 mit einer Häcksellänge von 4 mm lässt auf eine Ammoniakbildung durch die Stickland-Gärung schließen. [Ohshima & McDonald, 1978] Denkbar ist auch eine Nitratreduktion während der Silierung. Bei der Konversion von Milchsäure zu Essigsäure werden Wasserstoffionen frei. Nitrat dient als Wasserstoffakzeptor und wird bis zum Ammoniak reduziert.

In den Maissilagevarianten mit einer Häcksellänge von 4 mm wurde eine höhere Aktivität an Gärschädlingen wie Clostridien oder Hefen gegenüber den Varianten mit einer Länge von 8 mm gemessen.

Die einzelnen Werte der flüchtigen Bestandteile der Silagen sind im Anhang 8.2 tabelliert.

4.5.2.2 Roggensilage der Erntejahre 2006 und 2007

Die Gehalte an Trockensubstanz der Varianten der Silage von 2006 und 2007 sind im Vergleich mit den Rohstoffen der jeweiligen Jahre in Abb. 4-19 aufgeführt.

Der Abb. 4-19 kann entnommen werden, dass die Trockensubstanzgehalte der Roggensilage geringer sind als die der Rohstoffe. Der Grad der Konversion der Trockensubstanz und weiterer Inhaltsstoffe wie Cellulose, Hemicellulose und Lignin ist in Abschnitt 4.5.4 aufgeführt. Tetlow & Mason [1987] wiesen, vergleichbar mit den Ergebnissen dieser Arbeit, für Roggen-, Gersten- und Weizensilage nach, dass sich der Gehalt an Trockensubstanz durch eine Silierung reduzierte.

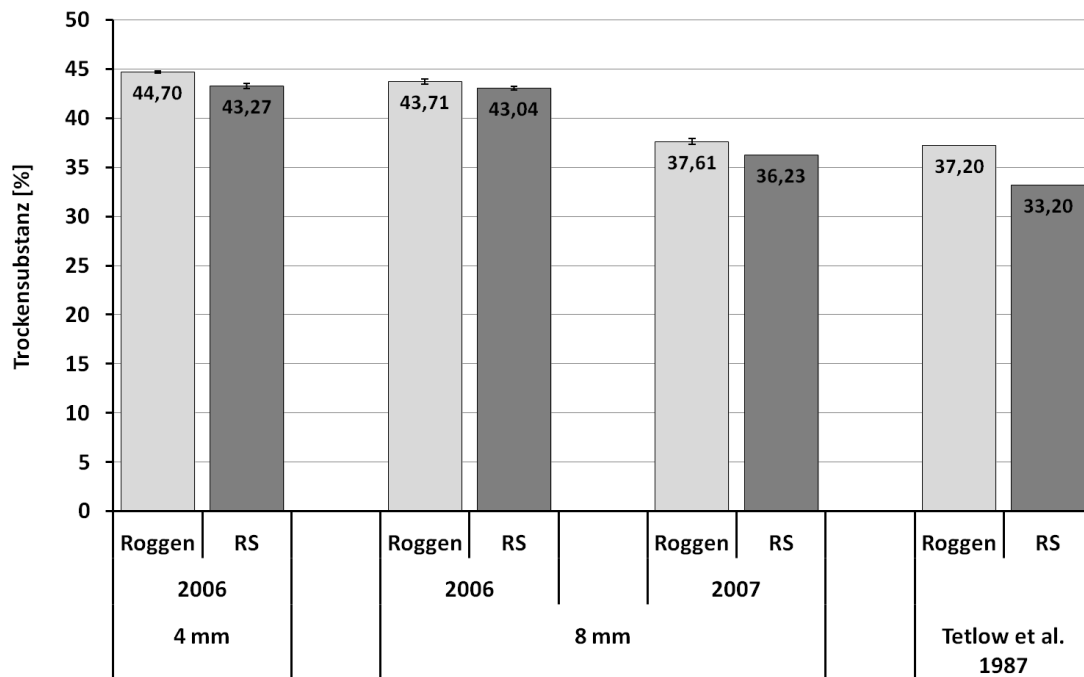


Abb. 4-19: Gemittelte Trockensubstanzgehalte von Roggen und Roggensilagen unterschiedlicher Erntejahre und Häcksellängen im Vergleich mit Literaturwerten (RS = Roggensilage)

Der Anteil an Cellulose, Hemicellulose und Lignin lag in der Silage von 2006 bei den 4 bzw. 8 mm Häckseln bei 64,65 bzw. 61,37 % i.TS und damit rund 30 % höher als bei der Maissilage von 2006. Die Roggensilage von 2007 mit einem Gehalt an Lignocellulose von 66,37 % i.TS wies einen höheren Anteil an Gerüstsubstanzen im Vergleich mit der Silage von 2006 auf. Vergleichbare Werte von 61,20 % an Gerüstsubstanzen in der Trockensubstanz zeigten die Untersuchungen von Tetlow & Mason [1987].

Der Gehalt an flüchtigen Fettsäuren lag für die Roggensilage des Jahres 2006 bezüglich der 4 bzw. 8 mm langen Häcksel in der Summe bei 2,04 bzw. 1,91 %. Durch eine Silierung des Roggens von 2007 wurde eine Säurekonzentration von 2,24 % erzielt. Angaben von Tetlow & Mason [1987] bestätigen diese Werte. Es wurde ein Gehalt an Milch- und Essigsäure von 1,90 % angegeben. Die Roggensilagen von 2006 wiesen mit 1:3 ein optimales Verhältnis von Essigsäure zu Milchsäure auf. Ein wesentlich höheres Verhältnis von 1:6 war bei der Roggensilage des Erntejahres 2007 zu messen.

Der Anteil an Ethanol in den Silagen unterschiedlicher Erntejahre und Häcksellängen variierte stark. Die Häcksel der Silage von 2006 mit einer Länge von 4 mm wiesen einen Wert von 1,78 % auf. Bei den 8 mm Häckseln konnte kein Alkohol detektiert werden. Die des Roggens von 2007 wiesen einen Anteil von 0,15 % auf. Das während der Silierung entstandene Ethanol kann Haupt- oder Nebenprodukt unterschiedlicher Gärungen von heterofermentativen Milchsäurebakterien, Hefen oder Clostridien sein.

Die Ammoniakgehalte von 0,09 bzw. 0,10 % oder 0,06 % wurden in der Roggensilage von 2006 mit einer Häcksellänge von 4 bzw. 8 mm oder des Jahres 2007 mit einer Häcksellänge von 8 mm nachgewiesen. Tetlow & Mason [1987] gaben einen vergleichbaren Gehalt von 0,04 % an.

Dem Anhang 8.2 können die einzelnen Messwerte bezüglich der Inhaltsstoffe und flüchtigen Bestandteile der einzelnen Roggensilagen entnommen werden.

4.5.3 Gärverluste in Abhängigkeit von der Zeit

Während des Silierprozesses treten Massenverluste auf. Massenverluste bezeichnen eine messbare Gewichtsabnahme des „verschlossenen Laborsilos“ während der Lagerung bzw. Konservierung, hervorgerufen durch eine Diffusion von Gärgasen bzw. flüchtigen Bestandteilen wie z. B. Kohlendioxid, Wasserstoff, Stickoxide und Ammoniak aus dem Laborsilo in die Umgebung. Wird beim Berechnen ein Korrekturfaktor berücksichtigt, welcher das Verbleiben von Gärgasen im Siliergefäß beschreibt, wobei es sich vorrangig um an der Oberflächenstruktur der Silage absorbiertes Kohlenstoffdioxid handelt, so können Gärverluste ermittelt werden. Geringe Massen- bzw. Gärverluste sind Anforderungen an Silagen sowohl für die Tierfütterung als auch für die Biogasproduktion. [Neureiter, 2004]

Die Gärverluste⁴ der unbehandelten Silagen dieser Arbeit liegen, unabhängig von der Häcksellänge, nach einer Konservierzeit von ca. 90 Tagen für die Mais- bzw. Roggensilagen bei 3,6 - 4,9 % bzw. 3,2 - 5,0 %. Kalzendorf [2002] ermittelte für Mais- bzw. Grassilagen vergleichbare Gärverluste von 4,2 - 6,6 %. Unterschiede zwischen den gemessenen Gärverlusten gab es hauptsächlich beim Vergleich der Silagen verschiedener Erntejahre (Abb. 4-20). Die Maissilage des Jahres 2006 zeigte sowohl mit 4 als auch 8 mm langen Häckseln einen geringeren Gärverlust als die des Jahres 2005. Die FNR [2010] gab Abhängigkeiten zwischen Gärverlusten und flüchtigen Fettsäuren an. Bei höheren Gehalten an Milchsäure in den Silagen wurden tendenziell geringere Gärverluste gemessen, während mit zunehmendem Essigsäuregehalt höhere Gärver-

⁴Ergebnisse siehe Anhang 8.3

luste auftraten. Die Essigsäuregehalte der Varianten der Maissilage von 2005 lagen über denen der Maissilage von 2006 und damit auch der Gärverlust.

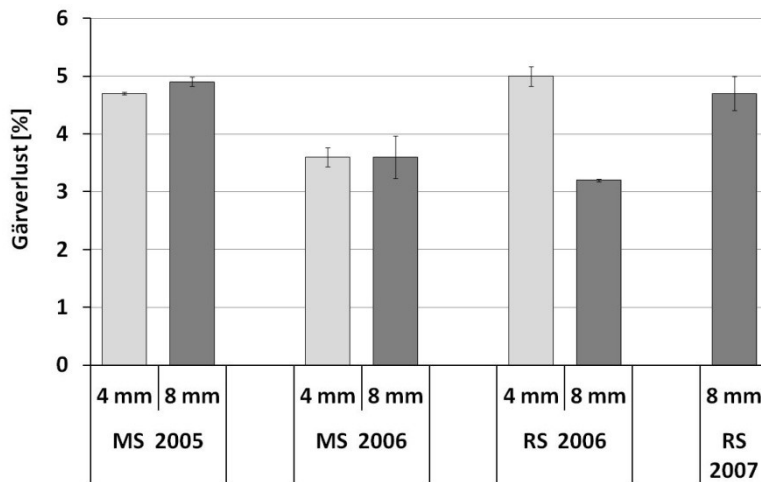


Abb. 4-20: Durchschnittliche Gärverluste von Mais- und Roggensilagen unterschiedlicher Erntejahre und Häcksellängen nach 90 Tagen der Konservierung (MS = Maissilage, RS = Roggensilage)

Unterschiedliche Häcksellängen beeinflussten bei den Maissilagen nicht die Höhe der Gärverluste. Abweichend verhält sich dieser Zusammenhang bei den hergestellten Roggensilagen. Mit der Roggensilage 2006 wurden unter Anwendung von Häckseln mit einer Länge von 4 mm höhere Gärverluste als mit 8 mm langen Häckseln nachgewiesen. Da sich die Varianten

mit 4 oder 8 mm Häckseln in den Gehalten an Fettsäuren und Ammoniak glichen, ist der Unterschied in den Verlusten durch die stark differierenden Alkoholgehalte zu erklären. Die Variante mit höherem Alkoholgehalt wies einen höheren Gärverlust auf. Aufgrund fehlender Indikatoren wie Butter- oder Propionsäure in den Silagen sowie sich gleichende Essigsäuregehalte wird die Alkoholbildung bei der 4 mm-Variante auf das Wirken von Hefen zurückgeführt. Die Roggensilage von 2007 mit einer Häcksellänge von 8 mm zeigte gegenüber der Silagevariante aus dem Vorjahr einen höheren Gärverlust.

4.5.4 Zeitabhängiger Abbau von Rohstoff-Komponenten während der Silierung

Bei den Roggensilagen wurde in der Regel ein höherer Abbaugrad der Trockensubstanz von 2 bis 4 %, verglichen mit den Maissilagen, nachgewiesen. Die Werte für die Maissilagen lagen bei 0 bis 2 %.

Cellulose wurde zu 10 bzw. 15 % und damit in höchstem Maße bei der Maissilage mit 4 bzw. 8 mm Häckseln des Jahres 2006 degradiert, detaillierter ausgeführt in Abschnitt 4.6.2. Keine Reduktion in der Konzentration von Lignocellulose war bei der Maissilage von 2005 zu messen. Hinsichtlich der Roggensilagen zeigten sich auch Unterschiede im Abbauverhalten. Die Roggensilage von 2006 mit einer Häcksellänge von 4 bzw. 8 mm wies einen Abbau von 3 % des Lignins bzw. 6 % der Hemicellulose auf. Wurde Roggensilage von 2007 untersucht, war ein Abbau der Cellulose von 6 % messbar. Eine Abnahme an Lignocellulose beschrieb Filya [2004] bei der

Untersuchung der Silierung von Maissilage unterschiedlicher Erntestadien. Dabei wurde der partielle Abbau an Faserstoffen auf eine Hydrolyse unter sauren Bedingungen zurückgeführt.

4.5.5 Vergleich der Silagequalität

Die Prüfung der Silagequalität wurde mit einer sensorischen Beurteilung begonnen. Es wurde der Geruch, die Farbe und die Konsistenz geprüft. Wenige Gläser mit einem offensichtlichen weißen oder rötlichen Schimmelpilzbefall durch übliche Schimmelpilze wie *Penicillium roqueforti* oder *Monascus ruber* [Thaysen, 2007] wurden nicht für die Messungen verwendet. Der säuerliche und brotartige Geruch, das lockere, lose Gefüge sowie die grüne bis braune Farbe der hergestellten Silagen waren Merkmale der optimal vergärten Rohstoffe.

Ergänzend wurde eine Beurteilung auf chemischer Ebene durchgeführt. Laut DLG [2006] hat sich gezeigt, dass die Gärqualität vorzugsweise am Gehalt unerwünschter Stoffabbauprodukte zu bewerten ist. Die ermittelten Essigsäure- und Buttersäurewerte liegen in einem die Qualität der Silagen nicht mindernden Bereich. Zudem kann der pH-Wert einen Anhaltspunkt für die Höhe der Säuerung sein und daher einen möglichen Verderb anzeigen. Die pH-Werte der Silagen sind laut DLG [2006] optimal und lassen auf eine ausreichende Milchsäureproduktion schließen. Tab. 4-5 fasst die gemessenen Daten zur Ermittlung der Silagequalität zusammen.

Tab. 4-5: Qualität der hergestellten Silagen unterschiedlicher Erntejahre und Häcksellängen auf der Basis der Dichte ρ , des Gärverlustes G_v , der Hefekeimzahl und einer chemischen Bewertung laut DLG [2006] unter Bezug auf die Gehalte an Essigsäure ES, Buttersäure BS sowie auf den pH-Wert

Silage	ρ	G_v	Hefen	ES	BS	pH	DLG-Note
	[kg TS/m ³]	[%]	[KBE/ml]	[%]	[%]		Qualität
4 mm							
Maissilage 2005	195	4,7	-	0,48	0,004	3,84	sehr gut
Maissilage 2006	241	3,6	<10 ²	0,35	n.n.	3,85	sehr gut
Roggensilage 2006	183	5,0	10 ³	0,45	n.n.	4,25	sehr gut
8 mm							
Maissilage 2005	192	4,9	-	0,52	n.n.	3,91	sehr gut
Maissilage 2006	207	3,6	10 ³	0,36	n.n.	3,78	sehr gut
Roggensilage 2006	193	3,2	10 ⁴	0,48	n.n.	4,24	sehr gut
Roggensilage 2007	196	4,7	-	0,32	n.n.	3,80	sehr gut

n.n. = nicht nachweisbar

Verursacht durch den in der Röhrenstruktur der Roggenfasern eingeschlossenen hohen Sauerstoffgehalt und einer damit verbundenen geringeren Verdichtung der Rohstoffe während der Silierung, lagen die Dichten der Roggensilagen unter denen der Maissilage. In Laborversuchen von Pries & Leurs [2004] wurden gleich dieser Arbeit Dichten von 195 bis 226 kg TS/m³ für Maissilage gemessen. In der Praxis erzielte Spiekers [2005] Dichten für Maissilagen von 140 bis

230 kg TS/m³. Für Ganzpflanzensilagen mit einer Trockensubstanz von 15 bis 50 % gaben Weiß & Kaiser [2004] Werte von 160 bis 280 kg TS/m³ an. Die in dieser experimentellen Arbeit erzielten Dichten bei der Silierung der Rohstoffe liegen in den genannten Bereichen.

Die Gärverluste wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf die Silagequalität in dem Abschnitt 4.5.3 diskutiert.

Die Hefekeimzahlen⁵ wurden in den Silagen des Jahres 2006 nach einer Lagerzeit von einem Jahr analysiert. Die ermittelte Kontamination entspricht einem „normalen“ Keimbesatz von Silagen. Adler [2002] gab als Erfahrungswerte für Keimzahlen, welche Maissilagen hoher mikrobieller Qualität entsprechen, von < 6 log Koloniebildende Einheiten (KBE)/g für Hefen an. Die experimentell ermittelten Werte dieser Arbeit liegen zwischen 3 und 5 log KBE/g. Für Schimmelpilze gelten Werte von < 3 log KBE/g. Schimmelpilze wurden in den hergestellten Silagen nicht identifiziert.

4.6 Enzymatische Behandlung der Rohstoffe während der Silierung

4.6.1 Chemische Zusammensetzung der Silagen mit Enzymadditiven

4.6.1.1 Maissilage des Erntejahres 2005

Durch unterschiedliche Enzymzusätze zum Rohstoff Mais des Erntejahres 2005 während der Silierung ergaben sich hauptsächlich Differenzen in den Konzentrationen der Trockensubstanz, der wasserlöslichen Kohlenhydrate und der Faserstoffe. Die Ergebnisse der Analysen sind dem Anhang 8.2 zu entnehmen.

Die variierenden Gehalte der Bestandteile der Lignocellulose der unbehandelten und der mit Enzym versetzten Silagen (Abb. 4-21) zeigten, dass sich ein Enzymzusatz auf die Höhe des Gehaltes an Cellulose und Hemicellulose auswirken könnte. Ursachen für differierende Trockensubstanz-, Faser- und Kohlenhydratgehalte werden ausführlich im Abschnitt 4.6.2 diskutiert.

Die pH- und Ammoniakwerte wurden nicht durch Enzymzusätze beeinflusst, gemessen nach ca. 90 Tagen der Silierung. Durchweg ergab sich für die Varianten mit einer Häcksellänge von 4 mm ein pH-Wert von 3,8, die Häcksel mit einer Länge von 8 mm wiesen einen pH-Wert von 3,9 auf. Der Ammoniakgehalt wurde zu 0,03 und 0,04 % bestimmt.

⁵Analyseergebnisse siehe Anhang 8.3

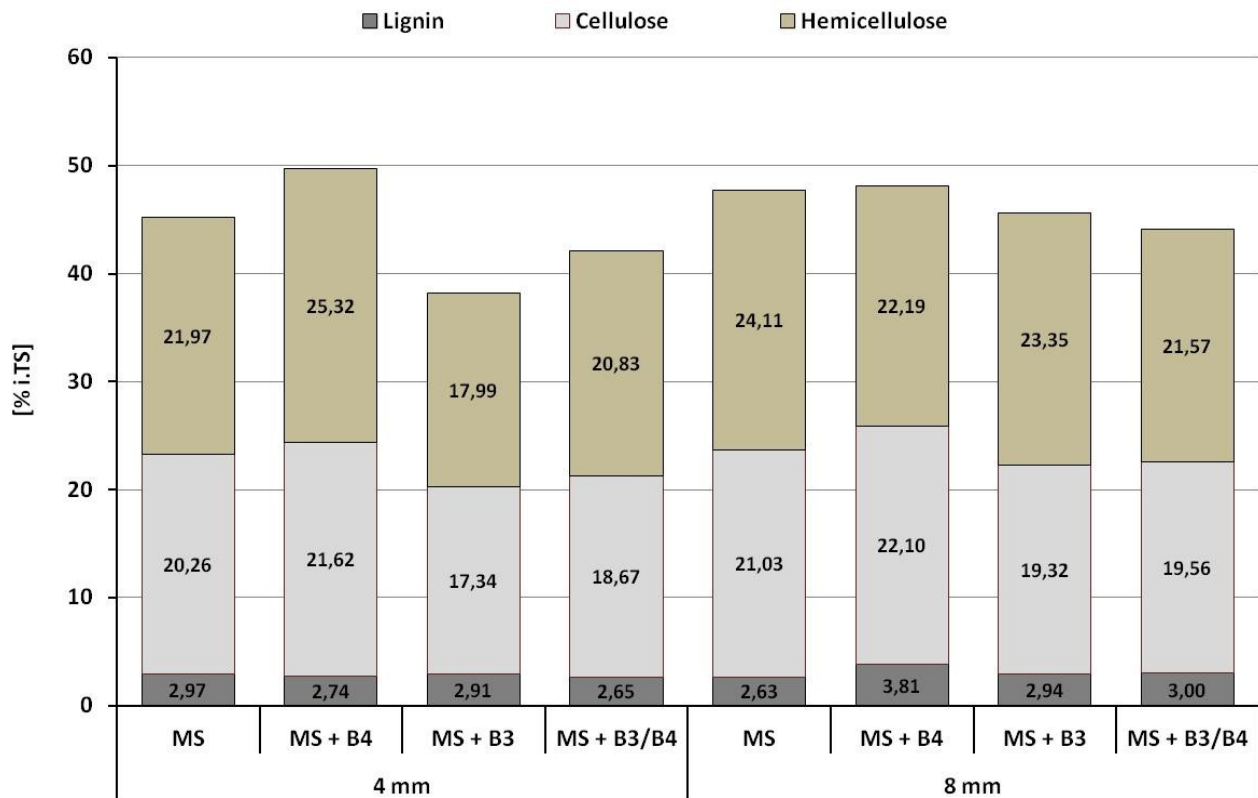


Abb. 4-21: Gemittelte Gehalte an Cellulose, Hemicellulose und Lignin der Maissilagen des Erntejahres 2005 mit und ohne Enzymzusatz (MS = Maissilage, B4 = Pektinase, B3 = Cellulase)

Die Maissilage von 2005 mit einer Häcksellänge von 4 oder 8 mm wies mit und ohne Enzymzusatz ein Verhältnis von Essigsäure zu Milchsäure von 1:3 auf. Durch die Dotierung von einzelnen Enzympräparaten oder der Enzymmischung konnten die Gehalte an Milch- und Essigsäure sowie der Alkoholgehalt bei den mit Enzym dotierten Varianten gesteigert werden. Deutliche Steigerungen waren mit dem Zusatz einer Pektinase oder einer Enzymmischung aus Cellulase und Pektinase zu messen. Die höchsten Essigsäuregehalte zeigten die Silagen mit 4 oder 8 mm Häcksellänge, welche mit Enzymgemischen versetzt wurden. Im Vergleich zur Kontrollvariante ohne Enzymbehandlung waren die Gehalte der Propionsäure niedriger in den mit Enzymen behandelten Silagen mit 4 oder 8 mm Länge. Gleiches konnten Sun *et al.* [2009] unter Anwendung einer Cellulase bei der Silierung von Maisstrünken und -blättern (Erntereste) nachweisen. Der Gehalt an Buttersäure in der Silage mit einer Häcksellänge von 4 mm wurde durch den Zusatz von Enzymen konträr zur Propionsäure gesteigert. Signifikant höhere Buttersäuregehalte in mit faserspaltenden Enzymen behandelten Bermudagrasssilagen gegenüber der unbehandelten Variante wiesen auch Mandebvu *et al.* [1999] nach. Die Varianten mit einer Häcksellänge von 8 mm enthielten keine Buttersäure. Generell lagen bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse der Proben mit gleicher Behandlungsmethodik bzw. gleichem Enzymzusatz die

Essigsäuregehalte bei den Varianten mit einer Häcksellänge von 8 mm höher als bei denen mit einer Länge von 4 mm.

Durch den Zusatz einer Cellulase wurde der Gesamtgehalt an Säuren um 3 % gesteigert. Mit Pektinase ließ sich der Säuregehalt bei den 4 bzw. 8 mm Häckseln um 10 bzw. 15 % steigern. Wird eine Mischung aus den genannten Enzymen eingesetzt, ergeben sich synergistische Wirkungen. Es konnte der Anteil an Säuren um 15 bzw. 18 % bei den 4 bzw. 8 mm langen Häckseln erhöht werden.

Die eingesetzten Enzympräparate steigerten den Gesamtalkoholgehalt um ein Vielfaches. Die größte Zunahme war unter Einsatz einer Pektinase oder der Enzymmischung ermittelt worden. Neben dem Hauptbestandteil Ethanol wurde bei allen enzymatisch behandelten Varianten Aceton detektiert. Die höchsten Werte waren unter Einsatz einer Enzymmischung bei den 4 und 8 mm langen Häckseln zu identifizieren. Saccharolytische Clostridienarten wie *Clostridium acetobutylicum* und *Clostridium beijerinckii* sind in der Lage, Kohlenhydrate ohne vorausgehende enzymatische Hydrolyse unter Bildung von Aceton, Ethanol und 1-Butanol zu verwerten. [Mutschlechner *et al.*, 2000] Bei der Variante mit einer Häcksellänge von 8 mm und einem Enzymcocktail aus Cellulase und Pektinase waren weiterhin Methanol und n-Propanol nachzuweisen. Methanol sowie Spuren von 1,2-Propandiol waren Bestandteil der Probe mit 4 mm-Häckseln und Pektinase. Die 4 mm-Variante der Maissilage mit einem Zusatz an Cellulase und Pektinase enthielt geringe Mengen an Methanol. Methanol kann Abbauprodukt eines Pektinabbaus sein. Es wurde primär in den Varianten, welche mit einer Pektinase versetzt waren, detektiert. Es ist ebenso Endprodukt der mikrobiellen Methanolbildung von pektinolytischen Bakterienstämmen wie *Clostridium butyricum*, *Erwinia chrysanthemi* und *Pseudomonas sp.*, welche hohe Aktivitäten an Pektin-Methylesterasen aufweisen [Schink & Zeikus, 1980]. Zudem können sich die im Lignin vorhandenen Methoxy-Phenyl-Ethergruppen der Coniferyl- und Sinapylalkoholeinheiten durch Hydrolyse in Methanol und einen phenolischen Rest spalten und somit Methanol aus Ligninen freigesetzt werden. Methanol kann im Biogasprozess direkt von Methanbildnern wie *Methanosarcina sp.* umgesetzt oder über eine Homoacetatgärung durch *Clostridium sp.* für die Methanisierung in Form von Essigsäure für den Biogasprozess bereitstehen. Methanol wird dabei dissimilativ über den Acetyl-CoA-Weg umgesetzt. Sind hohe Mengen an Methanol vorhanden, kann neben Essigsäure auch Buttersäure gebildet werden. [Anonymus] Aceton und Methanol waren nicht Bestandteil der Maissilagen ohne Enzymzusatz.

4.6.1.2 Maissilage des Erntejahres 2006

Die Parameter Trockensubstanz, wasserlösliche Kohlenhydrate und Cellulose, Hemicellulose sowie Lignin schwankten, wie auch bei den Maissilagen des Erntejahres 2005, hinsichtlich ihrer Gehalte beim Vergleich der unterschiedlich vorbehandelten Silagen. Die chemische Zusammensetzung ist im Anhang 8.2 aufgeführt.

Ein Enzymzusatz wirkte sich bei der Maissilage von 2005 in den meisten Fällen auf die Zusammensetzung der Lignocellulose aus (Abb. 4-22). Der Abbau an Lignocellulose der einzelnen Silagen wird in Abschnitt 4.6.2 beschrieben.

Gleich den Ergebnissen der Maissilage von 2005, wurden der pH-Wert sowie der Gehalt an Ammoniak von der Enzymgabe nicht beeinflusst. Es wurde ein einheitlicher pH-Wert von 3,8 und Ammoniak in Höhe von 0,02 bis 0,03 % gemessen.

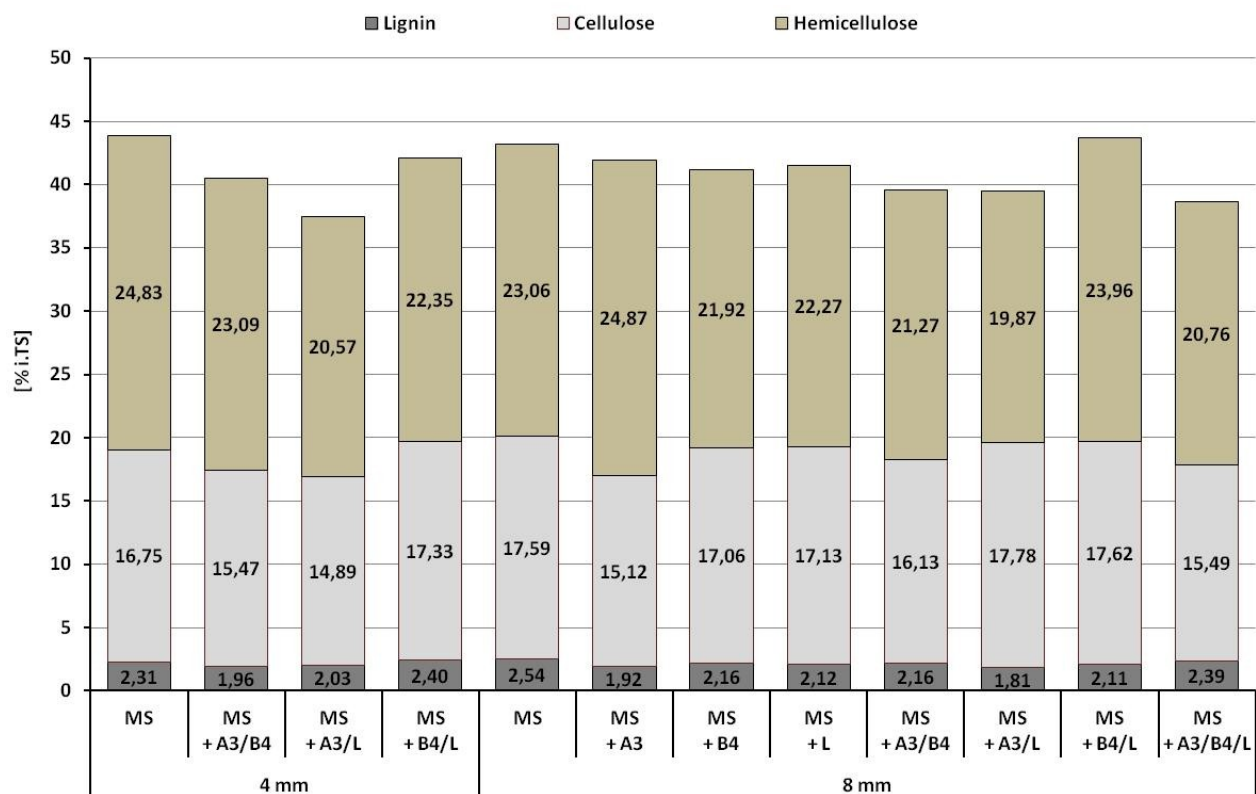


Abb. 4-22: Gemittelte Gehalte an Cellulose, Hemicellulose und Lignin der Maissilagen des Erntejahres 2006 mit und ohne Enzymzusatz (MS = Maissilage, A3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase)

Die Maissilagen von 2006 mit und ohne Enzymdotierung enthielten als Gärsäuren Milch- und Essigsäure in einem Verhältnis von 5:1. Fehlgärungen konnten in Form weiterer flüchtiger Fettsäuren nicht identifiziert werden. Wurden den 4 mm-Häckseln Enzympräparate aufgesprüht, konnte nach einer Konservierungszeit von 90 Tagen eine Steigerung des Gehaltes an Gesamtsäure und -alkohol nachgewiesen werden. Der Essigsäuregehalt stieg bei allen Varianten durch

eine enzymatische Vorbehandlung. Auffällig waren eine Abnahme von Milchsäure und eine Zunahme von Essigsäure bei der Variante mit Cellulasezusatz und einer Häcksellänge von 8 mm. Zudem bewirkte der Zusatz einer Cellulase einen Anstieg des Alkoholgehaltes, welcher über dem der weiteren enzymatisch behandelten Maissilagen von 2006 mit einer Häcksellänge von 8 mm lag. Dies impliziert erhöhte Aktivitäten von Clostridien oder Hefen. Auch n-Propanol konnte in der genannten Probe nachgewiesen werden. Ohne n-Propanol in der Probe waren die Silagen, unabhängig von der Häcksellänge, mit einem Zusatz an Cellulase und Pektinase sowie die Silagen mit einer Häcksellänge von 8 mm und einem Zusatz an A3/L, B4/L und A3/B4/L.

4.6.1.3 Roggensilage des Erntejahres 2006

Geringfügige Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung⁶ ließen sich nach Enzymzugabe bei den wasserlöslichen Kohlenhydraten und den Faserstoffen messen. Wie bei den Maissilagen kam es auch hier zu Veränderungen in der Zusammensetzung der Lignocellulose durch den Zusatz ausgewählter Enzymzusätze (Abb. 4-23). Die Abbaugrade der Bestandteile der Lignocellulose sowie die Veränderungen hinsichtlich der wasserlöslichen Kohlenhydrate sind im Abschnitt 4.6.2 wiedergegeben.

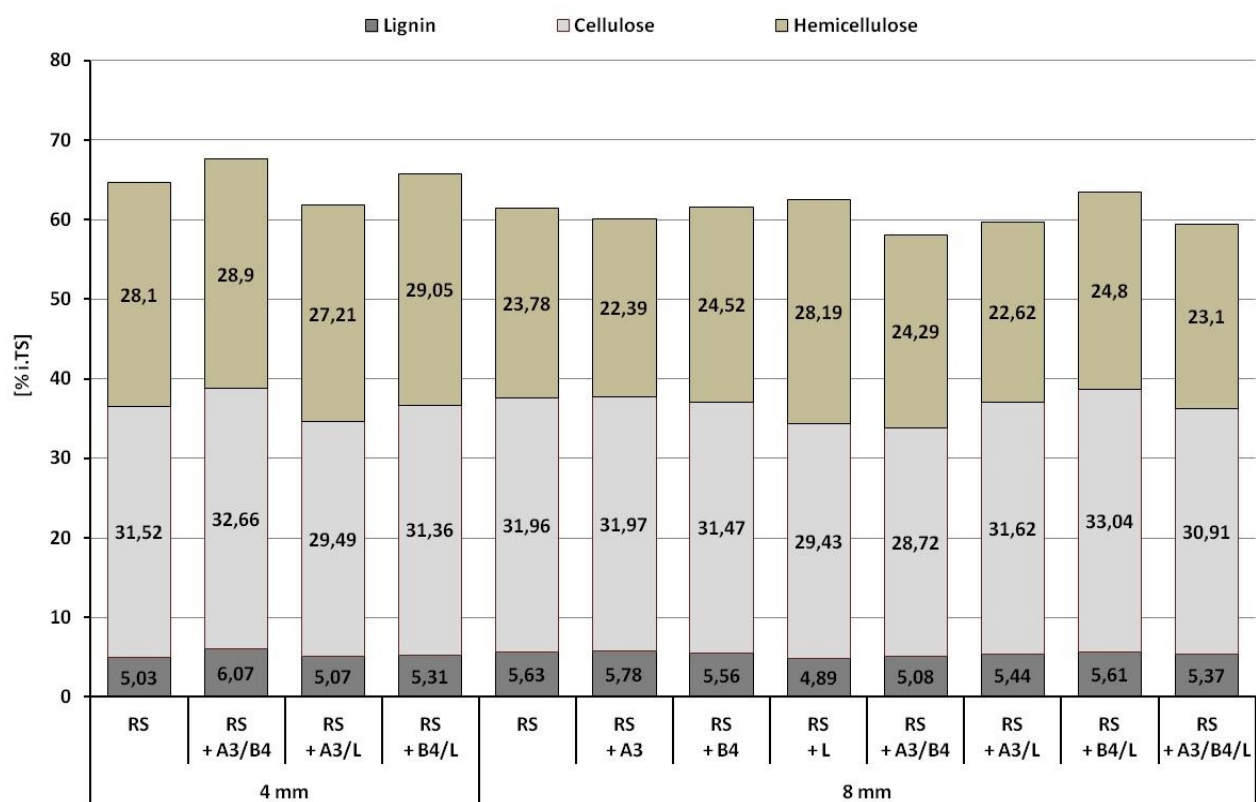


Abb. 4-23: Gemittelte Gehalte an Cellulose, Hemicellulose und Lignin der Roggensilagen des Erntejahres 2006 mit und ohne Enzymzusatz (RS = Roggensilage, A3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase)

⁶Analyseergebnisse siehe Anhang 8.2

Gleich den Ergebnissen der Maissilagen hatte der Enzymeinsatz bei der Roggensilage keinen Einfluss auf den pH-Wert oder den Ammoniakgehalt. Gemessen wurde ein pH-Wert von 4,2 und eine NH_3 -Konzentration von 0,09 bis 0,10 %.

Die ermittelten Gehalte an flüchtigen Bestandteilen⁷ zeigten eine Steigerung der Gesamtsäure durch das Hinzufügen von Enzympräparaten zum Erntegut. Eine Ausnahme bildet die Variante mit einem Zusatz von B4/L und einer Häcksellänge von 4 mm. Die Essigsäuregehalte wurden bis auf zwei Ausnahmen, Laccase- oder Pektinasezusatz (8 mm Häcksel), durch die Anwendung von Enzympräparaten gesteigert. Eine beachtliche Zunahme an Essigsäure von 75 % war bei der 8 mm-Variante mit einem Zusatz an A3/B4/L zu messen. Essigsäure entsteht überwiegend bei der heterofermentativen Milchsäuregärung, Diacetyl-gärung oder der Homoacetatgärung der Bakteriengattung *Clostridium* (z. B. *Clostridium aceticum*). Das Verhältnis von Essigsäure zu Milchsäure lag bezüglich der unbehandelten und enzymatisch behandelten Roggensilagen bei 1:3.

Durch die Verwendung von Enzympräparaten bei den 4 mm langen Häckseln wurde der Gehalt an Alkohol, hauptsächlich Ethanol, erheblich gesteigert. Der Zusatz einer Mischung von Cellulase und Pektinase führte zum höchsten Anstieg des Alkoholgehaltes von 51 %. Denkbar sind aufgrund der hohen Abbauraten der Kohlenhydrate Umsetzungen durch Hefen und/oder heterofermentativen Milchsäurebakterien. Bei den Häckseln mit einer Länge von 8 mm waren Alkohole nicht oder nur in Spuren analysierbar. Hermann *et al.* [2009] konnten dem gleichend mit unterschiedlichen Maissorten hohe Anteile einwertiger Alkohole bei der Silierung von Rohstoffen mit „feiner“ (4,7-5,4 mm) Häcksellänge nachweisen. Die Silagen mit „mittlerer“ (6,3-8,4 mm) und „grober“ (7,9-9,9 mm) Häcksellänge lagen im Gehalt an Alkoholen weitaus geringer.

4.6.1.4 Roggensilage des Erntejahres 2007

Ein Zusatz von biokatalytisch wirksamen Präparaten beeinflusste den Gehalt an wasserlöslichen Kohlenhydraten und Lignocellulose. Die Zusammensetzung der Lignocellulose ist in der Abb. 4-24 aufgeführt. Der Abbau an Lignocellulose sowie die Kohlenhydratumsetzungen sind ausführlich im Abschnitt 4.6.2 beschrieben.

Die Gesamtheit der Varianten wies einen pH-Wert von 3,8 und einen Gehalt an Ammoniak von 0,06 % auf. Damit konnte wiederholt bewiesen werden, dass sich Enzymzusätze nicht auf die

⁷Analyseergebnisse siehe Anhang 8.2

Höhe des pH-Wertes und die Ammoniakkonzentration auswirken. Die Konzentrationen der flüchtigen Bestandteile und ausgewählter weiterer Inhaltsstoffe sind im Anhang 8.2 dargelegt.

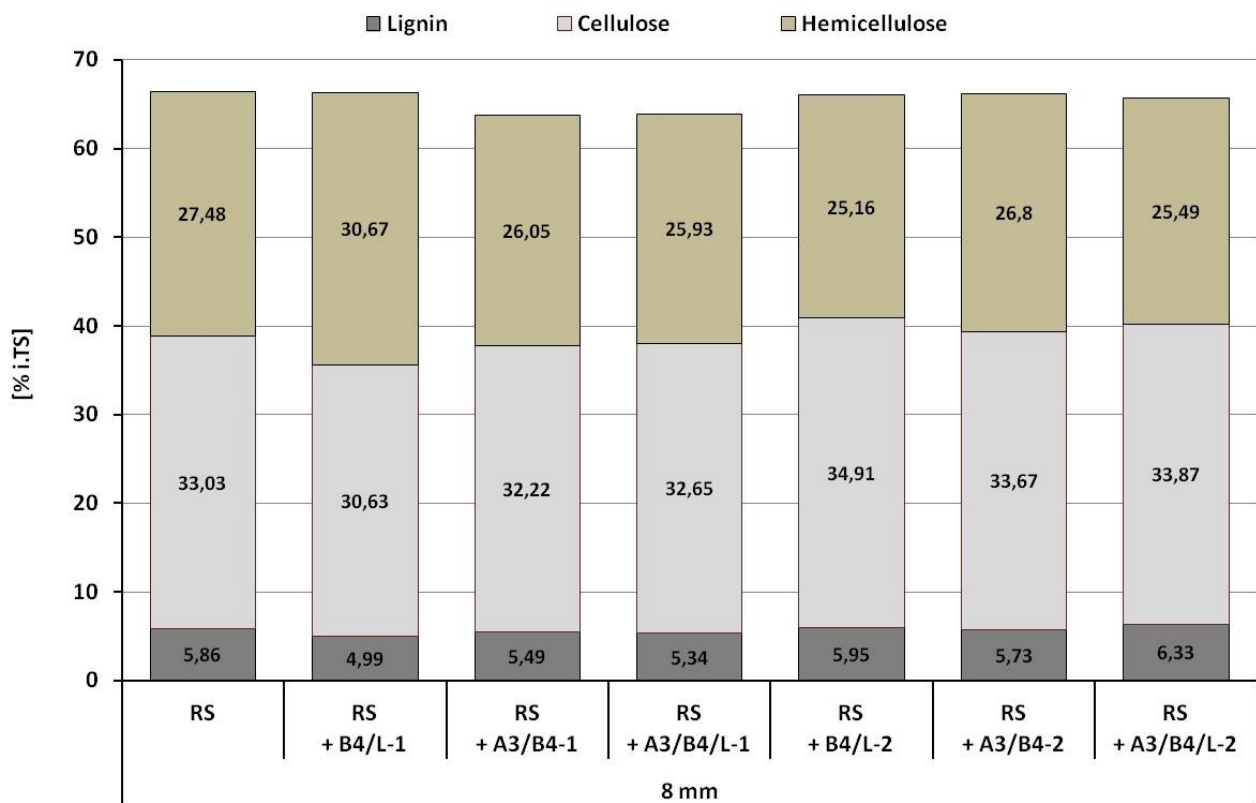


Abb. 4-24: Gemittelte Gehalte an Cellulose, Hemicellulose und Lignin der Roggensilagen des Erntejahres 2007 mit und ohne Enzymzusatz (RS = Roggensilage, A3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase, Enzym-1 = 0,07 g Enzym/kg Roggen, Enzym-2 = 0,14 g Enzym/kg Roggen)

In den Proben der Roggensilage mit und ohne Enzym wurden Milch- und Essigsäure in einem Verhältnis von 6:1 nachgewiesen. Die Konzentration an Gesamtsäure nahm durch den Einsatz von Enzympräparaten zu. Bis auf die Variante mit der Enzymmischung B4/L konnte eine Steigerung der Konzentration an Essigsäure gemessen werden. Der Anteil an Milchsäure nahm bei allen Silagen mit Enzymbehandlung zu. Aus den Ergebnissen lässt sich folgern, dass vor allem eine homofermentative Milchsäuregärung stattfand. Milchsäure und Ethanol, welche in höchstem Maße detektiert wurden, sind neben Kohlendioxid Endprodukte der heterofermentativen Milchsäuregärung von z. B. *Leuconostoc mesenteroides* [Sara, 2004].

Der Alkoholgehalt wurde auch bei dieser Silage um ein Vielfaches erhöht, proportional der Enzymkonzentration. Nahezu alle Varianten wiesen einen geringen Anteil an Methanol auf. Aceton wurde bei zwei Varianten analysiert: A3/B4-2 bzw. A3/B4/L-2. Nur bei Proben mit höchster Enzymgabe war Aceton identifizierbar. Frei von Alkoholen wie Methanol und Aceton war die Silage mit einem Zusatz an A3/B4/L-1.

Der höchste Gehalt an flüchtigen Fettsäuren und Alkohol wurde mit einer Enzymmischung aus Cellulase, Pektinase und Laccase in der höchsten eingesetzten Konzentration ermittelt.

4.6.2 Abbauverhalten der Lignocellulose

Die während der Silierung stattfindenden Veränderungen bezüglich der Cellulose, der Hemicellulose, des Lignins und der wasserlöslichen Kohlenhydrate⁸, wurden für die mit und ohne Enzym behandelten Proben ermittelt.

Maissilage 2005

In der Tab. 4-6 sind die Abbaugrade der Trockensubstanz (TS), organischen Trockensubstanz (oTS) sowie der Hauptbestandteile der Lignocellulose und die Zunahme der wasserlöslichen Kohlenhydrate (WSC) der Maissilagen von 2005 mit und ohne enzymatischer Behandlung während der Silierung dargestellt.

Bei den Varianten ohne Enzymzusatz war kein Abbau bezüglich der TS, oTS und der Lignocellulose zu messen.

Tab. 4-6: Abbaugrad (Mittelwerte) der Trockensubstanz TS, organischen Trockensubstanz oTS, Cellulose, Hemicellulose und des Lignins sowie Zunahme (Mittelwerte) der wasserlöslichen Kohlenhydrate WSC von den während der Silierung nicht behandelten und vorbehandelten Maissilagen des Erntejahres 2005 mit variierenden Häcksellängen

	Abbau [%]					Zunahme [%]
	TS	oTS	Cellulose	Hemicellulose	Lignin	WSC
Maissilage 4 mm	0	0	0	0	0	-
Maissilage + B3	1	2	9	17	0	154
Maissilage + B4	12	14	0	0	6	224
Maissilage + B3/B4	13	14	14	16	10	415
Maissilage 8 mm	0	0	0	0	0	0
Maissilage + B3	8	9	8	6	0	124
Maissilage + B4	6	7	0	9	0	119
Maissilage + B3/B4	11	12	11	17	0	847

B3 = Cellulase, B4 = Pektinase

Der Zusatz einer Cellulase bewirkte einen Abbau an TS, oTS, Cellulose und Hemicellulose. Cellulolytische Aktivitäten sowie hemicellulolytische Nebenaktivitäten wurden durch Enzymaktivitätsbestimmungen bei der Cellulase B3 nachgewiesen (Abschnitt 4.2). Die eingesetzte Pektinase reduzierte die Anteile an TS und oTS in der Maissilage. Vereinzelt wurden Wirkungen in Bezug auf die Hemicellulose und das Lignin gemessen. Die Zugabe einer Mischung aus Cellulase und Pektinase führte zu einem synergistischen Effekt und unabhängig vom Häcksel-

⁸Analyseergebnisse siehe Anhang 8.2

grad zum höchsten Abbau von Cellulose und Hemicellulose. Verschiedene Autoren beschreiben einen wesentlich stärkeren Umsatz der Gerüstsubstanzen bei unterschiedlichen Grünfuttersilagen durch eine Enzymmischung verglichen mit Einzelpräparaten. Vorwiegend handelte es sich um Gemische aus Cellulasen und Hemicellulasen oder Cellulasen, Hemicellulasen und Pektinasen. [Selig *et al.*, 2008; Dean *et al.*, 2005; Weinberg, 1995; Stokes, 1992] Es wurde unter Zusatz des Enzymcocktails ein Abbau an TS, oTS, Cellulose und Hemicellulose ermittelt. Lignin konnte bei den Häckseln mit einer Länge von 4 mm zusätzlich modifiziert werden. Es wird angenommen, dass die hohen Abbauraten in Bezug auf die 4 mm langen Häcksel durch eine bessere Zugänglichkeit aufgrund einer größeren Oberfläche der Partikel, im Vergleich mit den 8 mm-Häckseln, zustandekommen.

Resultat des Abbaus an Cellulose und Hemicellulose durch den Einsatz der Enzymmischung war ein enormer Anstieg an WSC von 415 bzw. 847 % bei den 4 bzw. 8 mm langen Häckseln im Vergleich zur unbehandelten Roggensilage. Eine Steigerung an reduzierenden Kohlenhydraten um 400 % durch den Einsatz einer Mischung aus Cellulasen, Glucosidasen, Hemicellulasen und Amylasen konnten auch Henk & Linden [1992] nach Einwirkung auf Hirse verzeichnen. Aufgrund der leichten Hydrolysierbarkeit der Hemicellulose wurde diese in besonderem Maße durch den Enzymeinsatz in saurem Milieu abgebaut.

Dem Abbau an WSC bei den unbehandelten Silagen steht eine Zunahme an WSC bei den mit Enzymen versetzten Proben entgegen. Die Enzyme bewirkten demnach einen starken Abbau an Kohlenhydrat-enthaltenden Polymeren während der Silierung. Die Menge an neu gebildeten, leicht abbaubaren Kohlenhydraten übersteigt die von den Mikroorganismen umgesetzte Menge, so dass eine Zunahme und kein Abbau analytisch belegt wurden.

Maissilage 2006

Aufgrund geringerer Enzymkonzentrationen, dem Einsatz von Cellulase A3 anstatt Cellulase B3 sowie dem Einsatz einer Laccase waren, verglichen mit den Maissilagen von 2005, Umsetzungen divergenter Art bei den Untersuchungen mit Mais von 2006, festzustellen. Die Zu- und Abnahmen der Gehalte ausgewählter Parameter sind in der Tab. 4-7 zusammengefasst.

Ohne Enzymbehandlung nahm der Gehalt an TS und oTS in der Maissilage mit einer Häcksel-länge von 4 mm um 2 % ab. Neureiter *et al.* [2005] ermittelten für Maissilage mit einer Trockensubstanz von 34,92 % bei einer Silierzeit von 119 Tagen eine ähnliche Abbaurate von 1 %. Im Rahmen der eigenen experimenteller Arbeiten war bei der auf 8 mm gehäckselten Maissilage von 2006 wie bei der Maissilage von 2005 keine Konzentrationsabnahme an Trockensubstanz nachzuweisen.

Tab. 4-7: Abbaugrad (Mittelwerte) der Trockensubstanz TS, organischen Trockensubstanz oTS, Cellulose, Hemicellulose und des Lignins sowie Zunahme (Mittelwerte) der wasserlöslichen Kohlenhydrate WSC von den während der Silierung nicht behandelten und vorbehandelten Maissilagen des Erntejahres 2006 mit variierenden Häcksellängen

	Abbau [%]					Zunahme [%]
	TS	oTS	Cellulose	Hemicellulose	Lignin	WSC
Maissilage 4 mm	2	2	10	0	0	-
Maissilage + A3/B4	5	5	19	0	15	0
Maissilage + A3/L	3	3	21	8	10	0
Maissilage + B4/L	3	3	8	0	0	0
Maissilage 8 mm	0	0	15	0	0	0
Maissilage + A3	3	3	29	0	21	145
Maissilage + B4	5	5	21	5	12	0
Maissilage + L	4	4	20	2	14	0
Maissilage + A3/B4	5	5	26	8	13	258
Maissilage + A3/L	5	5	18	14	27	0
Maissilage + B4/L	2	2	16	0	12	48
Maissilage + A3/B4/L	5	5	29	10	4	470

A3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase

Die Komponenten Cellulose und Lignin wurden am stärksten durch die Enzymgabe beeinflusst. Henk & Linden [1992] stellten Abbaugrade von 30 % für Cellulose mit der höchsten Enzymkonzentration von 10 U Enzymmix/g Hirse und einer Hydrolysezeit von 17 Tagen vor. Ein Abbau an Cellulose von 14 % konnte nach 33 Tagen der Hydrolyse und einer geringeren Konzentration von 1 U/g Hirse ermittelt werden. Die in dieser Arbeit gemessenen Abbauraten lagen in gleichen Größenordnungen. Durch Enzymgaben stieg der Celluloseabbau an und lag über dem Abbaugrad der nicht behandelten Silage, ausgenommen der Silage mit 4 mm langen Häckseln und einem Zusatz an Pektinase und Laccase. Der höchste Anstieg des Celluloseabbaus konnte bei den mit Cellulase oder Cellulase, Pektinase und Laccase versetzten Silagen mit einer Häcksellänge von 8 mm gemessen werden. Der Abbau stieg von 15 % auf 29 %. Lignin wurde partiell bei den enzymbesetzten Maissilagen mit einer Häcksellänge von 4 oder 8 mm abgebaut, auch hier ausgenommen der Silage mit 4 mm langen Häckseln und einem Zusatz an Pektinase und Laccase. Die höchste Abbaurate war unter Dotierung mit Cellulase und Laccase auf die Maishäcksel mit einer Länge von 8 mm messbar und lag bei 27 %.

Ein Effekt durch die Enzymgabe war bezüglich des Hemicelluloseabbaus vereinzelt messbar. Die höchste Abbaurate von 14 % zeigte die Silage mit einem Zusatz an Cellulase und Laccase.

Die Proben, welche den höchsten Abbau an Cellulose zeigten, wiesen die höchste Zunahme an wasserlöslichen Kohlenhydraten auf. Die stärkste Kohlenhydratfreisetzung mit 470 % wurde durch den Zusatz einer Mischung aus Cellulase, Pektinase und Laccase erzielt.

Die Cellulase A3 zeigte eine Wirkung gegenüber Cellulose und Lignin bei den 8 mm langen Häckseln. In den Versuchen zur Bestimmung der Enzymaktivitäten, siehe Abschnitt 4.2, konnten cellulolytische Aktivitäten nachgewiesen werden. Oxidative Aktivitäten waren Untersuchungsgegenstand bei den Laccasen, aber nicht bei den Cellulasen, Hemicellulasen und Pektinasen. Dementsprechend sind keine Aussagen zum oxidativen Vermögen der Cellulase zu erwarten. Der gemessene Ligninabbau kann auf oxidative Nebenaktivitäten hinweisen. Colombatto *et al.* [2004] konnten durch den Einsatz des Enzympräparates Liquicell 2500⁹ während der Silierung von Mais ebenso eine Abnahme des ADF-Wertes (Cellulose + Lignin) nachweisen.

Auch das Einzelpräparat mit einer ligninolytischen Hauptaktivität, Laccase L, war in der Lage, Lignocellulose partiell während der Silierung von 8 mm-Häckseln zu degradieren. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass genügend Restsauerstoff in den Poren der Silage für oxidative Reaktionen vorhanden und demnach ein Ligninabbau möglich war. Maute *et al.* [2001] führten biomimetrische Modellanalysen zum enzymatischen Abbau von Lignin unter Anwendung der Modellschubstanz Syringasäure bei unterschiedlichen pH-Werten durch und schlossen aus ihren Ergebnissen, dass Laccasen in der Lage sind, Teile des Lignins enzymatisch abzubauen. Bei einem pH-Wert von 4,0 herrschten optimale Bedingungen. Der in der Silage nach wenigen Tagen der Silierung vorherrschende niedrige pH-Wert von 3,8 war folglich optimal für die Wirkung der Laccase. Das Präparat Laccase L zeigte zudem in Enzymaktivitätsbestimmungen ausgeprägte cellulolytische, hemicellulolytische sowie pektinolytische Begleitaktivitäten. Aufgrund der vorhandenen Aktivitäten konnte auch in Bezug auf Cellulose und Hemicellulose ein Abbau ermittelt werden.

Roggensilage 2006

Die Enzympräparate A3, B4 und L wurden, identisch der Maissilage von 2006, bei der Roggensilage von 2006 eingesetzt. Different waren die Anfangsfeuchte sowie der Lignocellulosegehalt der unterschiedlichen Silagen. Der 2006 geerntete Roggen wies einen bedeutend höheren Anteil an TS sowie Lignocellulose auf (Abschnitt 4.5.2). Dadurch lässt sich der geringere Abbau an Lignocellulose durch die zugesetzten Enzympräparate im Vergleich mit der Maissilage erklären. Dass der Feuchtegehalt und der Gehalt an Lignocellulose, vor allem des Lignins, bedeutende Einflüsse auf enzymatische Hydrolysen haben, bewiesen Cullis *et al.* [2004] in Versuchen mit Weichholz. Je höher der Feuchtegehalt und geringer der Ligninanteil in den Proben waren, desto höhere Glucoseausbeuten konnten bei der enzymatischen Hydrolyse erzielt werden. Tab. 4-8 gibt

⁹Liquicell 2500 - Xylanase, Endo-/Exoglucanase, β -Glucosidase, α -Amylase (*Trichoderma reesei*)

die Abbauraten für die TS, oTS und die Hauptbestandteile der Lignocellulose sowie die Zunahmen an WSC wider.

Ein geringer Abbau von 4 bzw. 2 % an TS und oTS wurde bei den Silagen ohne Enzymzusatz und einer Häcksellänge von 4 bzw. 8 mm nachgewiesen. Der Abbau steigerte sich durch den Zusatz verschiedenartiger Enzympräparate und -mischungen. Ausgenommen davon ist die Probe mit einem Laccasezusatz. Enzymmischungen wirkten bei den 8 mm Häckseln effektiver als die Einzelpräparate. Die höchste Abbaurate von 7 % war unter Einsatz von Häckseln mit einer Länge von 4 mm und einer Dotierung von Cellulase und Pektinase nachzuweisen.

Tab. 4-8: Abbaugrad (Mittelwerte) der Trockensubstanz TS, organischen Trockensubstanz oTS, Cellulose, Hemicellulose und des Lignins sowie Zunahme (Mittelwerte) der wasserlöslichen Kohlenhydrate WSC von den während der Silierung nicht behandelten und vorbehandelten Roggensilagen des Erntejahres 2006 mit variierenden Häcksellängen

	Abbau [%]					Zunahme [%]
	TS	oTS	Cellulose	Hemicellulose	Lignin	WSC
Roggensilage 4 mm	4	4	0	0	3	-
Roggensilage + A3/B4	7	7	0	0	0	570
Roggensilage + A3/L	6	6	0	0	0	777
Roggensilage + B4/L	6	6	1	0	4	441
Roggensilage 8 mm	2	2	0	6	0	0
Roggensilage + A3	3	3	0	12	0	0
Roggensilage + B4	3	3	0	1	0	0
Roggensilage + L	2	2	3	0	6	3
Roggensilage + A3/B4	4	4	6	3	4	28
Roggensilage + A3/L	4	4	0	10	0	0
Roggensilage + B4/L	4	4	0	1	0	0
Roggensilage + A3/B4/L	4	3	1	9	0	0

A3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase

Bei den 4 mm-Häckseln konnte nahezu kein Abbau von Lignocellulose gemessen werden. Ein geringer Abbau an Cellulose und Lignin wurden bei der Variante mit einer Mischung aus Pektinase und Laccase erzielt. Laut Herstellerangaben verfügt die Pektinase über cellulolytische Nebenaktivitäten. Die Laccase betreffend, wurde mittels Enzymaktivitätsbestimmungen eine katalytische Wirkung gegenüber Cellulose unter sauren Bedingungen nachgewiesen (Abschnitt 4.2). Goel & Ramachandran [1983] führten die Abnahme der Hydrolyserate bei der Partikelreduktion von Reisstroh darauf zurück, dass sich die zugängliche Oberfläche durch ein Kollabieren der porösen Struktur des Materials reduzierte.

Bis auf die Variante mit einer zugesetzten Laccase, wurde bei allen Varianten mit einer Häcksellänge von 8 mm ein Abbau an Hemicellulose ermittelt. Die eingesetzte Cellulase wies den höchsten Abbau an Hemicellulose auf. In den Bestimmungen der Enzymaktivitäten war die

Cellulase A3 das Enzympräparat mit der höchsten Wirkung in Bezug auf das Modellsubstrat Arabinoxylan (Abschnitt 4.2). Die Zumischung einer Pektinase bzw. Laccase oder beider Enzyme hemmte die katalytische Wirkung der Cellulase. Einen geringen Abbau an Cellulose zeigten die Laccase sowie die Mischungen aus A3/B4 und A3/B4/L. In Enzymaktivitätsbestimmungen wurden cellulolytische Aktivitäten bei der Laccase unter sauren Reaktionsbedingungen, wie diese bei der Silierung herrschen, nachgewiesen. Den höchsten Abbau an Lignin wies die Silage mit einem Zusatz an Laccase auf. Auch der Zusatz einer Mischung aus Cellulase und Pektinase führte zu einem Ligninabbau. Eine relativ gute Wirkung wird der Mischung aus Cellulase und Pektinase unter Anwendung von 8 mm Häckseln zugeschrieben. Die genannte Mischung wirkte sich auf alle Bestandteile der Lignocellulose aus und zeigte eine um 28 % gesteigerte Konzentration an niedermolekularen Kohlenhydraten im Vergleich mit der nicht behandelten Silagevariante. Im Gegensatz zur Roggensilage ohne enzymatische Behandlung war eine erhebliche Steigerung der Konzentration an WSC von 441 bis 777 % bei den mit Enzymen versetzten Häckseln mit einer Länge von 4 mm zu messen. Die Steigerung der Konzentration an Kohlenhydraten scheint nicht Folge eines Abbaus an Gerüstsubstanzen, sondern vermutlich Folge des Abbaus von Stickstoff-freien Extraktstoffen bzw. nicht-struktur-bildende Kohlenhydraten wie Stärke oder Fructan zu sein. Fructane kommen in Körnern von Getreide vor und bestehen aus wasserlöslichen Oligo- und Polysacchariden. Die zum Aufbau dienlichen Saccharide sind primär Saccharose und Fructose. Roggen ist das Getreide mit dem höchsten Anteil an Fructan [Bach Knudsen, 1997]. Die Gehalte an Fructan sind in Silagen niedriger als im frischen Material [Longland & Cairns, 2000]. Karpinnen *et al.* [2003] führten Fructangehalte für Roggen von 4,6 bis 6,6 % unter Variation der Roggensorte und Erntejahre auf.

Roggensilage 2007

Die Varianten der Roggensilage von 2007 umfassten nur Material mit einer Häcksellänge von 8 mm. Ein Verlust an TS und oTS wurde bei der enzymatisch behandelten sowie nicht vorbe-handelten Roggensilage ermittelt. Die Abbaugrade für die TS, oTS sowie Lignocellulose können der Tab. 4-9 entnommen werden.

Der Abbau an TS oder oTS wurde durch den Einsatz von Enzympräparaten gegenüber der nicht behandelten Roggensilage gesteigert. Bei Steigerung der Enzymkonzentration von 0,07 g/kg auf 0,14 g/kg nahm der Abbau an TS oder oTS bei allen Varianten zu. Eine Abnahme der NDF- oder

ADF-Fraktion mit Zunahme der Enzymkonzentration konnten auch Colombatto *et al.* [2004] unter Einsatz von Liquicell 2500¹⁰ bei der Silierung von Mais nachweisen.

Tab. 4-9: Abbaugrad (Mittelwerte) der Trockensubstanz TS, organischen Trockensubstanz oTS, Cellulose, Hemicellulose und des Lignins sowie Zunahme (Mittelwerte) der wasserlöslichen Kohlenhydrate WSC von den während der Silierung nicht behandelten und vorbehandelten Roggensilagen des Erntejahres 2007 mit einer Häcksellänge von 8 mm

	Abbau [%]					Zunahme [%]
	TS	oTS	Cellulose	Hemicellulose	Lignin	WSC
Roggensilage 8 mm	4	5	6	0	0	-
Roggensilage + B4/L-1	4	6	13	0	0	0
Roggensilage + A3/B4-1	7	8	11	0	0	77
Roggensilage + A3/B4/L-1	6	8	9	0	0	1158
Roggensilage + B4/L-2	7	8	3	0	0	251
Roggensilage + A3/B4-2	8	10	7	0	0	83
Roggensilage + A3/B4/L-2	8	9	7	0	0	62

A3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase, Enzym-1 = 0,07 g Enzym/kg Roggen, Enzym-2 = 0,14 g Enzym/kg Roggen

Die Hydrolyserate der Cellulose lag bei den mit und ohne Enzym versetzten Silagen zwischen 6 und 13 %. Adesogan [2005] nennt bei Ganzpflanzensilagen Abbaugrade für die Gerüstsubstanzen (NDF) bzw. für Cellulose und Lignin (ADF) von 0,4 bis 9 % bzw. 1 bis 12,8 %. Ein Abbau von Hemicellulose und Lignin wurde bei der Roggensilage von 2007 nicht registriert. Weinberg *et al.* [1995] ermittelten für Weizensilage und der Anwendung eines Gemisches aus Cellulase, Hemicellulase und Pektinase ebenfalls keinen Effekt bezüglich des im Pflanzenmaterial enthaltenen Lignins.

Vermutlich wurde aufgrund einer höheren Feuchte im Ausgangsmaterial, verglichen mit der Roggensilage von 2006, ein höherer Abbau an Cellulose bei gleicher Enzymierung (0,07 g/kg) erzielt. Höhere Enzymkonzentrationen von 0,14 g/kg bedingten eine Abnahme der Hydrolyserate von Cellulose in den Silagen von 2006. Aufgrund einer im Gegensatz dazu steigenden Abbaurate der oTS ist es denkbar, dass ein verstärkter Abbau Kohlenhydrat-haltiger Substanzen wie Stärke, Pektin oder Fructan durch die Enzymgabe stattfand.

Es wird vermutet, dass unterschiedlich hohe Abbauraten an strukturbildenden Kohlenhydraten wie Cellulose und Pektin oder nicht-strukturbildenden Kohlenhydraten wie Fructan und Stärke differierende Massenbalancen hinsichtlich der WSC erzeugten. Die eingesetzten Enzympräparate können zum Beispiel amylolytische Aktivitäten zur Spaltung der Stärke als Begleitaktivitäten aufweisen. Cellulase A3 enthält laut Herstellerangaben Amylase. In dieser Arbeit wurden die Enzympräparate nicht auf amylolytischen Aktivitäten geprüft. Desweiteren kann Fructan durch

¹⁰Liquicell 2500 - Xylanase, Endo-/Exoglucanase, β -Glucosidase, α -Amylase (*Trichoderma reesei*)

pflanzeneigene oder mikrobielle Enzyme zersetzt werden. Bekannt ist weiterhin, dass Hefen fructanhydrolysierende Fähigkeiten (z. B. Invertase) besitzen. Diese sind zur Spaltung von Fructanoligomeren unterschiedlicher Bindungstypen und Polymerisierungsgrade fähig. In Folge dessen werden WSC wie Fructose und Glucose freigesetzt. [Marx 1995] Auch kann anhand der gebildeten Methanolanteile in den Silagen ein Abbau an Lignocellulosebestandteilen bzw. Pektinpolymeren vermutet werden.

In Korrelationsanalysen wurde untersucht, inwieweit der Abbau eines Bestandteils der Lignocellulose sich auf den Abbau eines anderen Bestandteils der Lignocellulose auswirkt. Dazu wurden die Ergebnisse der unbehandelten und enzymatisch behandelten Mais- und Roggen-silagen einbezogen ($n = 41$). Sehr geringe Korrelationen wurden zwischen dem Hemicellulose- und Ligninabbau ($r = 0,177$) sowie dem Hemicellulose und Celluloseabbau ($r = 0,209$) ermittelt. Zwischen dem Abbau an Cellulose und Lignin gibt es jedoch eine signifikant positive Korrelation ($p < 0,001$). Der Korrelationseffizient betrug 0,687. Zusammenhänge dieser Art wurden von Kaya *et al.* [2000] in Bezug auf die enzymatische Vorbehandlung von Lignocellulosefasern der Zellstoff- und Papierindustrie untersucht. Die Hydrolyserate von Xylan, Bestandteil der Hemicellulose, stieg durch Dotierung von Ligninabbauprodukten wie Vanillinsäure, Acetovanillon und Protocatechusäure bzw. Vanillin und Guaiacol bei einer Konzentration des Ligninabbauprodukts bis 0,05 bzw. 0,2 % an, im Fall von Vanillinsäure und Protocatechusäure um 50 %. Ein Zusatz von Vanillin, Acetovanillon bzw. Guaiacol bei der Hydrolyse von Xylan erhöhte die Ausbeute an reduzierenden Kohlenhydraten um 15, 20 bzw. 175 %. In höheren Konzentrationen sind Inhibierungen der Enzymaktivität der Xylanase möglich. Wurde „gelöstes“ Lignin hinzugegeben, stieg die Hydrolyserate um mehr als 20 %. Die gemessenen Effekte wurden durch Änderungen der Molekularstruktur des Enzyms, Xylanase, bei der Interaktion zwischen Substrat und Enzym begründet. Gleichartige Effekte für die Hydrolyse von Cellulose wurden in vorhergehenden Untersuchungen mit Lignin, ligninhaltiger Schwarzlauge und monomeren Ligninkomponenten gemessen. [Kaya *et al.* 1998]

Untersucht wurden im Rahmen dieser experimentellen Arbeiten weiterhin die Zusammenhänge zwischen dem Abbau der lignocellulosischen Komponenten und den Konzentrationen der Milch-, Essig- und Gesamtsäure. Die Analyse ergab sehr geringe Korrelationen von 0,195 bzw. 0,139 zwischen dem Verlust an Hemicellulose bzw. Lignin und der Konzentration an Gesamtsäure. Zwischen dem Abbau an Cellulose und dem Gehalt an Gesamtsäure konnte eine positive Korrelation von 0,402 auf signifikantem Niveau ($p < 0,01$) nachgewiesen werden. Um zu spezifizieren, welche Art der Säurebildung durch den Celluloseabbau beeinflusst wurde, sind die Korrelationskoeffizienten zwischen der Milch- bzw. Essigsäure und dem Celluloseverlust

während der Silierung bestimmt worden. Ein signifikanter positiver Zusammenhang besteht zwischen dem Celluloseabbau und der Milchsäureproduktion ($r = 0,463$, $p < 0,01$). Die Milchsäureproduktion wurde marginal durch den Hemicellulose- bzw. Ligninabbau beeinflusst ($r = -0,100$ bzw. $r = 0,157$). Keine Abhängigkeit war zwischen der Milchsäure- und Kohlenhydratkonzentration messbar ($r = -0,024$). Die Bildung der Essigsäure steht in signifikantem Zusammenhang ($p < 0,001$) mit dem Abbau an Hemicellulose während der Silierung, mit einem Korrelationskoeffizienten von $0,541$. Geringe bzw. sehr geringe Korrelationen ($r = -0,272$ bzw. $r = -0,082$) wurden zwischen dem Cellulose- bzw. Ligninabbau und der Essigsäurekonzentration nachgewiesen. Die nach der Silierung in den Proben gemessene Konzentration an wasserlöslichen Kohlenhydraten korrelierte auf signifikantem Niveau mit der Essigsäurekonzentration ($r = 0,413$, $p < 0,01$) und dem Abbau an Hemicellulose ($r = 0,454$, $p < 0,01$). Eine geringe Korrelation zeigte sich zwischen der Kohlenhydratkonzentration und der Konzentration an Gesamtsäure sowie dem Cellulose- bzw. Ligninabbau. Die Korrelationskoeffizienten lagen bei $0,221$, $-0,173$ bzw. $-0,207$. Durch die Analysen konnte nachgewiesen werden, dass der Cellulose- bzw. Hemicelluloseabbau und die dadurch entstehenden Kohlenhydrate die Milchsäure- bzw. Essigsäurebildung fördern. Die vermehrte Bildung von flüchtigen Fettsäuren wie Milchsäure durch die Spaltung von Fasern in lösliche Zucker kann laut Hoffman & Muck [1999] zur schnellen Ansäuerung des pflanzlichen Materials beitragen, der metabolische Verbrauch an Kohlenhydraten reduziert und zum Erhalt der Energie in den Biomassen beigetragen werden.

4.6.3 Einfluss des Enzymzusatzes auf die Silagequalität

Chemische Prüfung der enzymatisch behandelten Silagen

Die zugesetzten Enzyme oder Enzymmischungen beeinflussten die Säurebildung nicht in dem Maße, dass die Qualität der Silagen, gemessen am Gehalt der Essig- und Buttersäure und dem pH-Wert¹¹ laut DLG-Schlüssel [2006], gemindert wurde. Bei den mit Enzym versetzten Mais-silagen von 2005 mit einer Häcksellänge von 4 mm führte die Bildung von Buttersäure nicht zu einer Qualitätsminderung, da der Buttersäuregehalt unter der Höchstgrenze von $0,3 \%$ i.TS lag. Das bei den unterschiedlichen Varianten der Maissilage von 2005 gemessene Gärnebenprodukt Propionsäure wurde durch den Einsatz von Enzymen reduziert. Die Wirkungen der Enzyme oder Enzymmischungen in Bezug auf die einzelnen Rohstoffe unterschiedlicher Häcksellänge sind in den Abschnitten 4.6.1.1 bis 4.6.1.4 dargestellt.

¹¹Analyseergebnisse siehe Anhang 8.2

Der Zusatz von Enzympräparaten kann zu veränderten Fermentationsmustern, Konzentrationen oder Verhältnissen hinsichtlich der Gärsäuren und -alkohole führen, beeinflusst aber in unwesentlichem Maße die Gärqualität der Silagen.

Einfluss der enzymatischen Behandlung auf die Massen- und Gärverluste

In dieser Arbeit wurden die Massenverluste¹² während der Silierung bzw. Lagerung über einen Zeitraum von ca. 365 Tagen erfasst. Eine Ausnahme bilden die Maissilagen von 2005. Es konnte ausschließlich der Massenverlust nach 109 Tagen der Silierung ermittelt werden.

Die Massenverluste der einzelnen Maissilagen von 2005 sind in der Abb. 4-25 gegenübergestellt. Es konnte ein höherer Massenverlust unter Anwendung von Häckseln mit einer Länge von 8 mm beim Vergleich mit den Massenverlusten der unbehandelten Maissilagen unterschiedlicher Häcksellängen gemessen werden. Die Differenz betrug 0,14 Prozentpunkte. Die erzielten Gärverluste¹² der 4 bzw. 8 mm langen und unbehandelten Häcksel, errechnet aus den Massenverlusten, wiesen eine Differenz von 0,2 Prozentpunkten auf. Die Werte lagen bei 4,7 bzw. 4,9 % und waren mit denen vergleichbar, welche Wyss [2006] in Untersuchungen mit Maissilage zweier Erntetermine im Labormaßstab mit gemessenen Werten von 4,8 bzw. 3,1 % bei einem Trockensubstanzgehalt von 28,5 bzw. 39,4 % ermittelte.

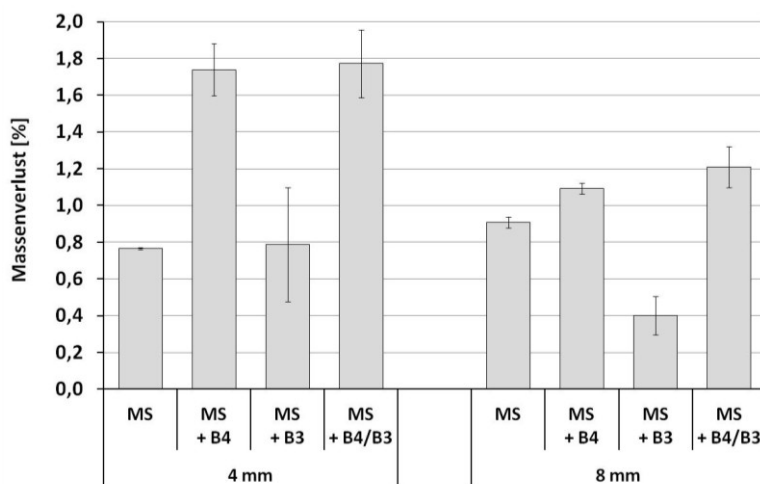


Abb. 4-25: Massenverluste der nicht behandelten und vorbehandelten Maissilagen des Erntejahres 2005 mit einer Häcksellänge von 4 oder 8 mm nach 109 Tagen der Konservierung (MS = Maissilage, B3 = Cellulase, B4 = Pektinase)

Nach 109 Tagen der Konservierung wiesen die Maissilagen von 2005 mit Enzymzusatz höhere Massenverluste gegenüber den Silagen ohne Zusatz auf, ausgenommen der Maissilage mit einem Zusatz von Cellulase und einer Häcksellänge von 8 mm. Durch den Cellulaseinsatz bei den 8 mm langen Häckseln wurde der Massenverlust reduziert. Abnehmende Gärverluste wiesen auch John *et al.* [1992] durch die Dotierung einer Cellulase

aus *Penicillium janthinellum* bei der Luzernesilierung nach. Der Zusatz der Enzymmischung aus Pektinase und Cellulase bewirkte bei den Häckseln mit einer Länge von 4 bzw. 8 mm die höchste Zunahme des Massenverlustes von 131 bzw. 33 % im Vergleich mit den Werten der

¹²Ergebnisse siehe Anhang 8.3

unbehandelten Maissilagen. Wurde die Pektinase als Einzelpräparat eingesetzt, konnten ähnliche Steigerungen der Massenverluste von 127 % bzw. 21 % gemessen werden. Da die Cellulase keinen Einfluss auf das 4 mm-Material zeigte oder den Massenverlust um 56 % senkte (8 mm), kann angenommen werden, dass die Pektinase in der Enzymkombination mit der Cellulase die deutliche Zunahme der Massenverluste bewirkte. Die erhöhten Massenverluste durch den Enzymeinsatz können laut Weinberg *et al.* [1995] auf eine verstärkte Kohlenstoffdioxidbildung unter Enzymeinfluss zurückgeführt werden, welche bei der Arbeit mit z. B. Weizensilage gemessen wurde.

Die Massenverluste der nicht enzymatisch behandelten Maissilagen von 2006 liegen unter denen der Maissilage von 2005. Die Werte können dem Anhang 8.3 entnommen werden. Die Maissilagen von 2005 wiesen einen höheren Essigsäuregehalt und eine geringere Dichte als die Maissilagen von 2006 auf. Daher wird angenommen, dass bei der Maissilage von 2005 heterofermentative Milchsäuregärungen oder Essigsäurebildungen durch Gärschädlinge ausgeprägter waren. Bei diesen Gärungsformen entstehen flüchtige Substanzen wie Kohlendioxid, welche aus dem Silo entweichen können. Andererseits kann, bedingt durch hohe Gehalte an Kohlenhydraten und/oder einen hohen Lufteintrag durch unzureichende Verdichtung, die alkoholische Gärung durch Hefen unter Wärmeentwicklung begünstigt werden, was hohe Trockenmasseverluste durch Verdunstung zur Folge hat. [Behrens, 2006]

Im Gegensatz zur Maissilage von 2005 wies die unbehandelte Maissilage von 2006 mit einer Häcksellänge von 8 mm nach einer Konservierzeit von 105 d nahezu den gleichen Massenverlust wie die Silage mit 4 mm langen Häcksel auf. Die Werte lagen für 4 bzw. 8 mm lange Häcksel bei 0,42 bzw. 0,40 %. Werden die Gärverluste betrachtet, kann kein Einfluss der Häcksellänge auf die Gärverluste nachgewiesen werden. Diese lagen sowohl für die 4 als auch 8 mm langen Häcksel bei 3,6 %.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Maissilage von 2005 konnten bei den mit Enzymen versetzten Maissilagen von 2006 mit einer Häcksellänge von 4 mm höhere Massenverluste¹³ als bei der Silage ohne Enzymzusatz gemessen werden. Wurden Häcksel mit einer Länge von 8 mm eingesetzt, lagen die Massenverluste der mit Enzym versetzten Silagen über denen der unbehandelten Silage, ausgenommen der Maissilagen mit einem Zusatz von Pektinase oder Pektinase und Laccase.

Vergleicht man die Maissilagen von 2006 mit gleicher enzymatischer Behandlung, aber unterschiedlichen Häcksellängen miteinander, wiesen die enzymatisch behandelten Silagen mit einer

¹³Ergebnisse siehe Anhang 8.3

Häcksellänge von 4 mm höhere Massenverluste als die vorbehandelten Silagen mit einer Häcksellänge von 8 mm auf.

Durch den Zusatz von Pektinase bzw. Pektinase und Laccase beim Mais mit einer Häcksellänge von 8 mm wurde eine geringe Abnahme des Massenverlustes nach der Konservierung von 105 d in Höhe von 4 bzw. 17 % gemessen. Wurde Pektinase und Laccase bei den 4 mm langen Häckseln eingesetzt, stieg der Massenverlust um 22 %. Im Gegensatz zu den Maissilagen von 2005 konnten bei der Anwendung von Cellulasepräparaten oder Enzymgemischen, welche Cellulase enthielten, Steigerungen um 74 % bis 187 % nachgewiesen werden. Es muss angemerkt werden, dass sich die eingesetzten Cellulasen bei den Maissilagen von 2005 und 2006 hinsichtlich der Herkunft und lignocellulolytischen Aktivitäten unterschieden. Der Einsatz einer Laccase hatte geringe Auswirkungen auf den Massenverlust. Dieser stieg um 7 %.

Sowohl bei der Maissilage von 2005 als auch bei jener von 2006 wurde der höchste Massenverlust nach der Konservierung beim Einsatz von 4 mm-Häckseln und einem Enzymmix aus Cellulase und Pektinase gemessen.

Die nachstehende Abb. 4-26 gibt den zeitlichen Verlauf der Massenverluste der einzelnen unbehandelten und behandelten Maissilagen von 2006 mit einer Partikellänge von 4 oder 8 mm über eine Zeitperiode von einem Jahr (368 d) wieder.

Die Silagen zeigten gleiche Initialphasen bei der Silierung von bis zu fünf Tagen, was darauf hinweist, dass die eingesetzten Enzympräparate die Startphase, also die Bildung von Milchsäure zur Absenkung des pH-Wertes in den ersten Tagen, nicht oder nur geringfügig beeinflussten. Die geringen Verluste der ersten Woche werden auf eine Restatmung in der sogenannten aeroben Phase, der Startphase, der Silierung zurückgeführt. Nach ca. zwei Wochen differenzierten sich die Verläufe durch einen unterschiedlich starken Kohlenhydratumsatz und Faserabbau sowie auftretende sekundäre Gärungen. Es wurde über den gesamten Versuchszeitraum eine Zunahme der Massenverluste bei den unbehandelten und enzymatisch vorbehandelten Maishäckseln verzeichnet. Bei der Silierung von unbehandeltem Mais wiesen auch Herrmann *et al.* [2011] einen Anstieg der Verluste von organischer Substanz mit zunehmender Lagerdauer nach. Werden die Partikel mit 4 mm Länge betrachtet, bleibt die unbehandelte Maissilage oder mit Pektinase und Laccase versetzte Silage nach einer Konservierzeit von 105 Tagen relativ stabil. Nach 371 Tagen wurde ein Gesamtverlust von 0,59 oder 0,86 % gemessen. Weniger stabil zeigten sich die Varianten unter Zusatz einer Mischung aus A3/L oder A3/B4. Der Gesamtverlust lag bei 1,7 bzw 2,1 %.

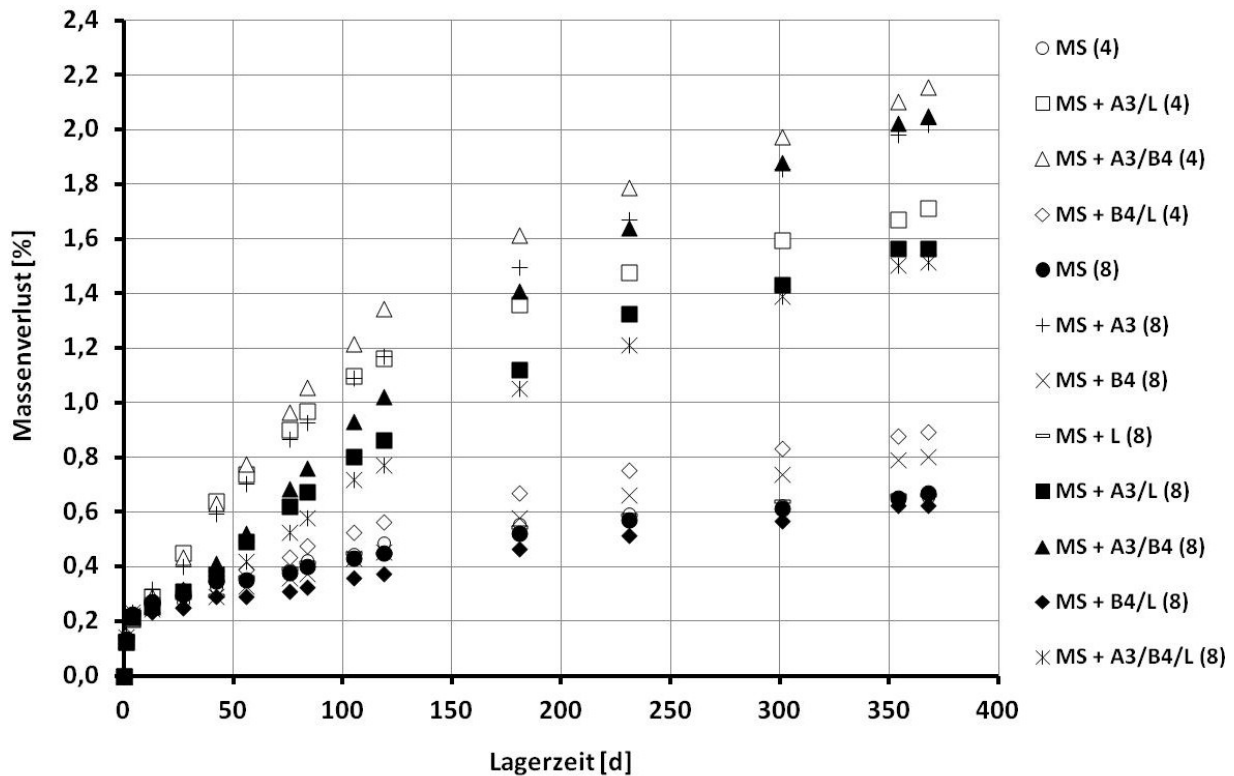


Abb. 4-26: Durchschnittliche Massenverluste der nicht behandelten und vorbehandelten Maissilagen des Erntejahres 2006 mit einer Häcksellänge von 4 oder 8 mm über einen Zeitraum von 368 Tagen (A3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase, MS = Maissilage, (4) = 4 mm Häcksellänge, (8) = 8 mm Häcksellänge)

Bezüglich der Silagen mit groberer Struktur wiesen die Maissilagen ohne Hilfsstoff, mit Pektinase, Laccase oder Pektinase und Laccase einen relativ stabilen Gärverlauf nach 105 d auf. Die Massenverluste stiegen wie in der Konservierungszeit nur geringfügig an und lagen nach einer Lagerdauer von 371 Tagen insgesamt bei 0,59; 0,69; 0,63 oder 0,56 %. Eine deutliche Zunahme der Massenverluste und folglich instabilere Gärverläufe zeigten die Proben mit einem Zusatz von Cellulase und den Enzymmischungen A3/B4, A3/L oder A3/B4/L. Die Werte lagen bei 1,8; 2,1; 1,4 oder 1,5 %. Insbesondere bei den mit Cellulase versetzten Maishäckseln stieg der Massenverlust in der Konservier- sowie der Lagerphase stark an.

Bei den unbehandelten und behandelten Roggensilagen von 2006 gab es zwischen den 4 bzw. 8 mm langen Häckseln deutliche Unterschiede in Bezug auf die Massenverluste. Die Werte können im Anhang 8.3 eingesehen werden. Durch das Zerkleinern auf 4 mm zeigte sich nach einer Konservierungszeit von 91 d, im Vergleich mit den 8 mm langen Häckseln, ein Anstieg des Massenverlustes von 0,28 % auf 1,1 % sowie ein Anstieg des Gärverlustes von 3,2 % auf 5,0 %.

Gleich den Ergebnissen der Maissilagen wurde unter Einsatz von Enzymen oder Enzymmischungen bei den 4 mm langen Häckseln während der Silierung von 91 Tagen ein Anstieg des Massenverlustes nachgewiesen. Die höchste Zunahme belief sich unter Anwendung der Enzym-

mischung Cellulase und Pektinase während der Silierung von Roggen auf 19 %. Nach einer Lagerzeit von 365 d lagen die Massenverluste für die unbehandelte Roggensilage und die Roggensilagen mit einer Applikation von A3/B4, A3/L oder B4/L in ähnlichen Größenordnungen, nämlich 1,8; 2,2; 2,1 bzw. 1,9 %. Weitaus geringer waren die ermittelten Massenverluste bei der Anwendung von 8 mm langen, unbehandelten oder enzymatisch behandelten Roggenhäckseln. Die Werte lagen in einem Bereich von 0,32 - 0,43 %. In höchstem Maße wurden die Massenverluste der Häcksel mit einer Länge von 8 mm durch die Dotierung der Einzelpräparate gesteigert. In der Konservierungsphase bzw. nach 91 d war die höchste Steigerung von 31 % unter Einsatz der Pektinase zu messen. In der sich anschließenden Lagerungsphase nahm der Massenverlust mit 66 % am stärksten durch den Zusatz einer Laccase zu. Durch die Anwendung der Präparatmischungen aus A3/B4 oder A3/L nahm der Massenverlust um 4 bzw. 5 % während der 91-tägigen Konservierungsphase ab.

Identisch mit den Ergebnissen der Maissilage von 2006 wurden bei den enzymatisch behandelten Roggensilagen von 2006 mit einer Häcksellänge von 4 mm höhere Massenverluste im Gegensatz zu den vorbehandelten Silagen mit einer Häcksellänge von 8 mm bei gleicher enzymatischer Behandlung nachgewiesen.

Werden die Verläufe der Massenverluste über einen Zeitraum von einem Jahr betrachtet, konnten für die mit und ohne Enzym versetzten Roggensilagen von 2006 identische Startphasen beobachtet werden, dargestellt in der Abb. 4-27.

Bis zum fünften Tag der Konservierung waren die Kurven deckungsgleich. In der Startphase lagen die Massenverluste der unbehandelten und behandelten Roggensilagen von 2006 in gleicher Höhe wie die der unbehandelten und behandelten Maissilagen von 2006. Während der Hauptgärphase waren stark ansteigende Kurven Merkmal der Roggensilagen mit einer Häcksellänge von 4 mm. Die Kurven der Silagen mit 8 mm langen Häckseln stiegen mäßig an, gefolgt von einem schwachen Anstieg in der Lagerphase. Es kann von einer nach 91 Tagen abgeschlossenen Konservierung und folglich sehr stabilen Silagen ausgegangen werden. Die Massenverluste nahmen in der Lagerphase um sehr geringe $\leq 0,1$ % zu. Im Gegensatz dazu stiegen die Massenverluste der 4 mm langen Häcksel um ein Vielfaches an. Die Kurve für die Roggensilage mit einer Häcksellänge von 4 mm und einem Zusatz an Cellulase und Laccase lag in der Haupt- sowie Lagerphase deutlich über den anderen Kurven. Diese Probe wies die höchste Zunahme an

niedermolekularen Kohlenhydraten während der Silierung auf, wodurch z. B. die mikrobielle Bildung von Alkoholen¹⁴ gefördert wurde.

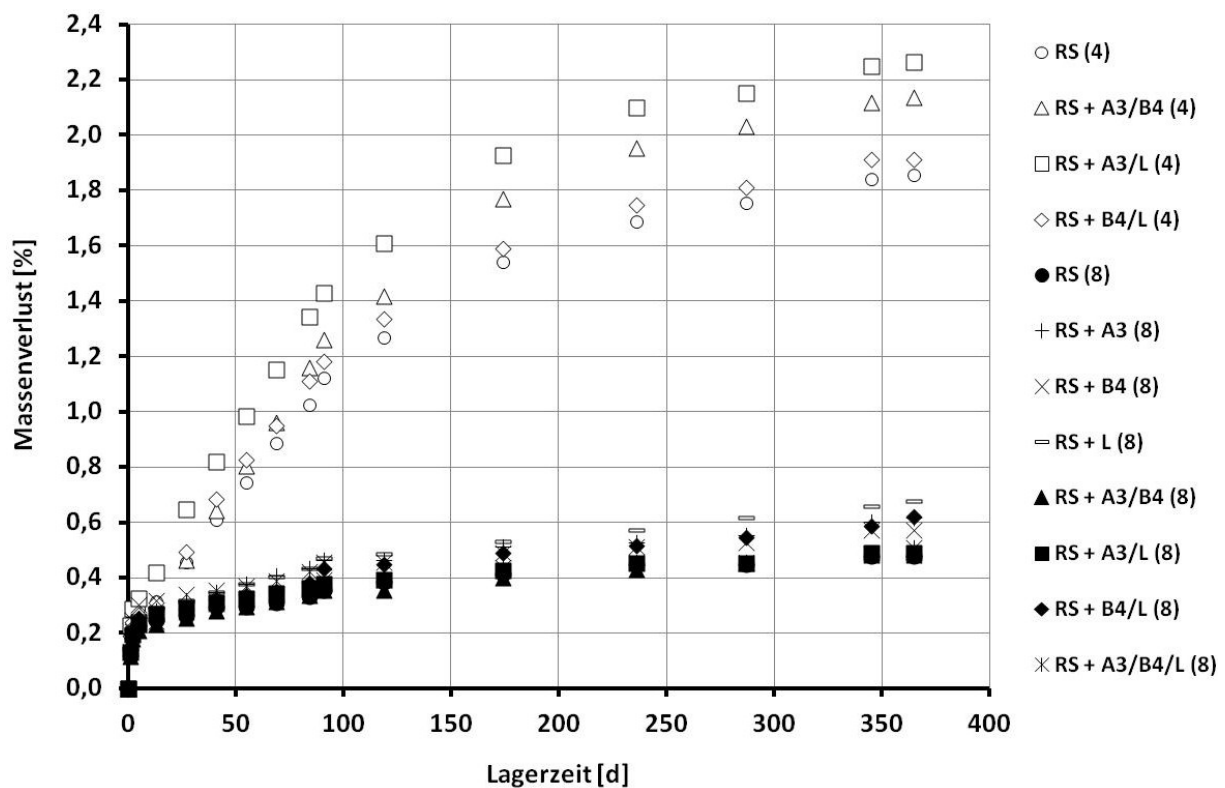


Abb. 4-27: Durchschnittliche Massenverluste der nicht behandelten und vorbehandelten Roggensilagen des Erntejahres 2006 mit einer Häcksellänge von 4 oder 8 mm über einen Zeitraum von 365 Tagen (A3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase, RS = Roggensilage, (4) = 4 mm Häcksellänge, (8) = 8 mm Häcksellänge)

Die Massenverluste¹⁵ der Roggensilagen von 2007 lagen über denen der Roggensilagen von 2006. Ursache dafür kann der höhere Feuchtegehalt¹⁴ der Roggensilage von 2007 sowie der stärkere Abbau an organischer Substanz wie z. B. der Cellulose während der Silierung und damit einer gesteigerten Bildung von wasserlöslichen Kohlenhydraten sein (Abschnitt 4.6.2), welche Edukte verschiedener sich anschließender Gärungen sein können.

Werden die unbehandelten Proben der Roggensilagen unterschiedlicher Erntejahre mit einer Häcksellänge von 8 mm nach der Silierung von ca. 90 Tagen verglichen, lag der Gärverlust bei der Roggensilage von 2007 um 1,5 Prozentpunkte höher. Dieser betrug 4,7 %.

Enzymzusätze erhöhten die Massen- bzw. Gärverluste der Roggensilage von 2007. Mit zunehmender Enzymkonzentration stiegen die Massen- bzw. Gärverluste. Die Differenzen zwischen der unbehandelten Roggensilage und den Behandelten lagen nach 89 Konservierungstagen zwischen 15 und 85 %. Wurde eine Enzymmischung aus A3/B4, B4/L oder A3/B4/L

¹⁴Analyseergebnisse siehe Anhang 8.2

¹⁵Ergebnisse siehe Anhang 8.3

während der Silierung von Roggen in einer Konzentration von 0,07 g/kg eingesetzt, so konnte nach 367 d ein Massenverlust von 1,5; 1,2 bzw. 1,5 % ermittelt werden. Dieser stieg durch die Erhöhung der Enzymkonzentration von 0,07 g/kg auf 0,14 g/kg auf einen Wert von 2,0; 1,4 bzw. 2,0 % an. Die Roggensilagen mit den Mischpräparaten, welche Cellulase enthielten, wiesen den stärksten Anstieg des Massenverlustes auf.

Analog der Mais- und Roggensilagen der Erntejahre 2005 bis 2006 wurde die Startphase während der Silierung des Roggens des Erntejahres 2007 von den zugesetzten Hilfsstoffen nicht beeinflusst, zeigte aber deutlich höhere Massenverluste (Abb. 4-28). Aerobe wie anaerobe Atmungen führten vermutlich zu hohen Gärverlusten in der Startphase. Nach 5 Tagen der Silierung differenzierten sich die Kurvenverläufe der Roggensilagen. Nach einer Konservierungszeit von 89 Tagen blieben die Silagen relativ stabil. Weniger stabil waren die Roggensilagen mit einem Zusatz an Cellulase und Pektinase oder Cellulase, Pektinase und Laccase in einer Konzentration von 0,14 g/kg. Die Kurven der zuletzt genannten Proben lagen deutlich über den anderen Kurven unbehandelter oder behandelter Roggensilagen.

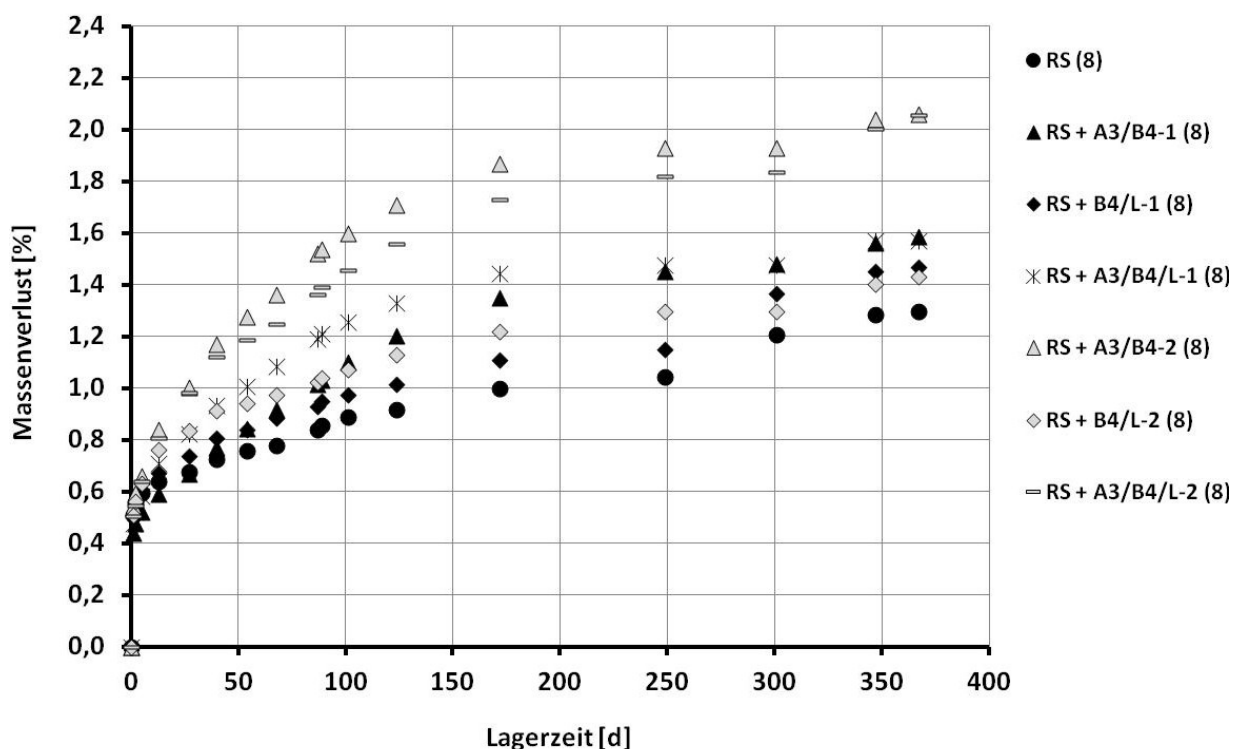


Abb. 4-28: Durchschnittliche Massenverluste der nicht behandelten und vorbehandelten Roggensilagen des Erntejahres 2007 mit einer Häcksellänge von 4 oder 8 mm über einen Zeitraum von 367 Tagen (A3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase, Enzym-1 = 0,07 g Enzym/kg Roggen, Enzym-2 = 0,14 g Enzym/kg Roggen, RS = Roggensilage, (8) = 8 mm Häcksellänge)

Es konnte wie bei den Maissilagen von 2005 bis 2006 festgestellt werden, dass die höchsten Massenverluste bei den Roggensilagen, welche mit Cellulase und Pektinase vor der Silierung versetzt wurden, messbar waren.

Fazit der Untersuchungen ist, dass die Enzympräparate oder -Mischungen beim Einsatz während der Silierung von Mais oder Roggen eine Steigerung der Massenverluste verursachten, von wenigen Ausnahmen abgesehen. Vervaeren *et al.* [2010] ermittelten höhere Trockenmasseverluste beim Einsatz eines Enzymadditivs während einer siebenwöchigen Silierung von Mais. Der Verlust stieg von 1,9 % auf 2,6 %. Tendenziell wurden höhere Verluste bei den mit Enzym versetzten Silagen mit einer Häcksellänge von 4 mm, im Vergleich mit den Häckseln von 8 mm Länge, nachgewiesen. Mit steigender Enzymkonzentration sind höhere Massen- bzw. Gärverluste zu erwarten. Am stärksten wirkte sich die Dotierung einer Mischung aus Cellulase und Pektinase auf den Massenverlust aus. Demzufolge können Enzyme die Stabilität der Silagen mindern. Welche Wirkungen die Abnahmen an Substanz auf die Biogasproduktion haben, wird in Abschnitt 4.9.2 diskutiert.

Die ermittelten Gärverluste der unbehandelten und enzymatisch behandelten Mais- bzw. Roggensilagen von 3,4 bis 8,8 % bzw. 3,1 bis 6,8 % liegen in einem für die Praxis akzeptablen Bereich. Von Galler [2011] wurde angegeben, dass bei der Konservierung Verluste von < 15 % Ziel sind.

Die Auftragung der Massenverluste gegen die Zeit stellen Kurvenverläufe polynomer Funktionen¹⁶ dar.

Es wurde ein positiver Zusammenhang zwischen der Alkoholkonzentration¹⁷ (GA) und dem Massenverlust¹⁸ bezüglich der im Zuge dieser Arbeit hergestellten Silagen nachgewiesen. Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten ergab eine starke Korrelation von 0,723 ($n = 41$, $p < 0,001$). Der genannte Zusammenhang ist in Abb. 4-29 grafisch dargestellt. Wurde eine Korrelationsanalyse für die einzelnen Mais- und Roggensilagen durchgeführt, konnten sehr starke Korrelationen bei den unbehandelten und behandelten Roggensilagen des Jahres 2006 bzw. 2007 von 0,992 ($n = 12$, $p < 0,001$) bzw. 0,972 ($n = 9$, $p < 0,001$) nachgewiesen werden. Korrelationsanalysen mit den im Jahr 2005 bzw. 2006 hergestellten Maissilagen zeigten Werte von 0,877 ($n = 8$, $p < 0,01$) bzw. 0,854 ($n = 12$, $p < 0,001$).

¹⁶Ermittelte Bestimmtheitsmaße siehe Anhang 8.7

¹⁷Analyseergebnisse siehe Anhang 8.2

¹⁸Ergebnisse siehe Anhang 8.3

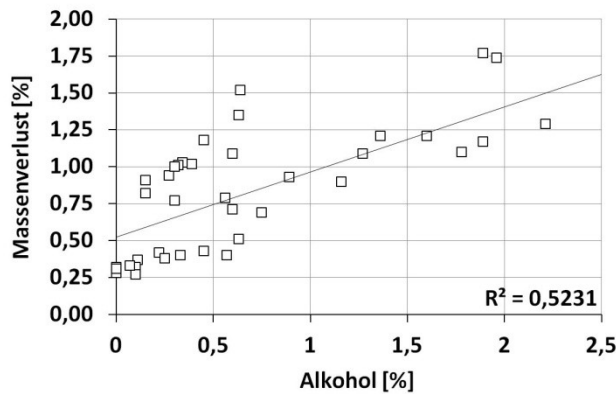


Abb. 4-29: Zusammenhang zwischen dem Massenverlust und der Gesamtmenge an Alkohol der mit und ohne Enzymzusatz hergestellten Mais- und Roggensilagen unterschiedlicher Häcksellänge nach einer Silierdauer von 90 Tagen; $n = 41$

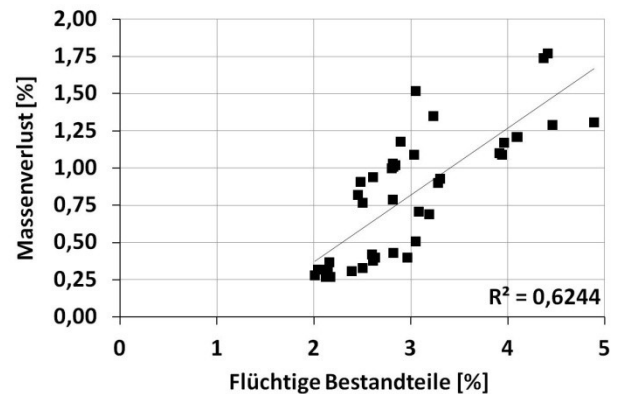


Abb. 4-30: Zusammenhang zwischen dem Massenverlust und der Summe an gemessenen flüchtigen Bestandteilen (GA, GS, NH_3) der mit und ohne Enzymzusatz hergestellten Mais- und Roggensilagen unterschiedlicher Häcksellänge nach einer Silierdauer von 90 Tagen; $n = 41$

Bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Summe an flüchtigen Bestandteilen¹⁷ der hergestellten Mais- und Roggensilagen ($\text{GA} + \text{GS} + \text{NH}_3$) und der Massenverluste¹⁹ konnte ebenfalls ein starker Zusammenhang bzw. ein Korrelationskoeffizient von 0,790 ($n = 41$, $p < 0,001$) nachgewiesen werden. In Abb. 4-30 ist der Zusammenhang bildlich dargestellt. Werden die Mais- und Roggensilagen einzeln betrachtet, liegen die Korrelationskoeffizienten für die Roggensilagen von 2006 bzw. 2007 bei 0,988 ($n = 12$, $p < 0,001$) bzw. 0,876 ($n = 9$, $p < 0,01$) und die der Maissilagen von 2005 oder 2006 bei 0,833 ($n = 8$, $p < 0,05$) oder 0,865 ($n = 12$, $p < 0,001$). Ähnlich dieser Arbeit wies Herrmann [2009b] bei der Silierung von Mais und Triticale positive, signifikante Zusammenhänge zwischen den aufsummierten Gehalten an Essigsäure, Buttersäure sowie der einwertigen Alkohole und dem Verlust an organischer Trockensubstanz nach.

Einfluss der enzymatischen Behandlung auf die Hefekeimzahl

In den Mais- und Roggensilagen von 2006 wurde die Hefekeimzahl¹⁹ bestimmt. Eine Zunahme an koloniebildenden Einheiten konnte bei der Maissilage von 2006 mit 4 mm langen Häckseln durch den Einsatz von Enzymgemischen nachgewiesen werden. Die 8 mm-Varianten wurden weniger stark beeinflusst. Durch einen Laccasezusatz bei den Mais- und Roggenhäckseln mit einer Länge von 8 mm nahm die Anzahl an Hefezellen tendenziell ab.

Keine oder marginale Effekte in Bezug auf die Hefekeimzahl zeigten sich beim Einsatz von Enzymen oder Enzymmischungen bei der Silierung des Roggens von 2006, ausgenommen die

¹⁹Analyseergebnisse siehe Anhang 8.3

Silage mit einer Applikation von Laccase. Ähnlich den Ergebnissen dieser Arbeit konnte Weinberg *et al.* [1995] nach der 45-tägigen Silierung von Weizen mit dem Zusatz einer Enzymmischung²⁰ keinen nennenswerten Effekt auf die Hefeanzahl nachweisen.

Allgemein lagen die Gehalte an Hefen in einem tolerierbaren Bereich, welcher bei $< 6 \log \text{ KBE/g}$ liegt [Adler, 2002].

4.7 Enzymatische Behandlung der Silage direkt vor dem Biogasprozess

4.7.1 Chemische Zusammensetzung der Silage mit Enzymadditiven

Durch eine Vorbehandlung der Roggensilage des Erntejahres 2007 veränderten sich hauptsächlich die Konzentrationen der Gerüstsubstanzen und wasserlöslichen Kohlenhydrate. Eine Zusammenfassung der Gehalte ausgewählter Inhaltsstoffe ist im Anhang 8.2 dargestellt. Im nachfolgenden Abschnitt wird auf den Abbau an Faserstoffen und die Zunahme an niedermolekularen Kohlenhydraten eingegangen. Die Ergebnisse bezüglich der pH-Werte und der flüchtigen Bestandteile werden in Abschnitt 4.7.4. diskutiert.

4.7.2 Anteil an reduzierenden Kohlenhydraten vor und nach der Behandlung

Anhand der Analyse des Gehaltes an reduzierenden Kohlenhydraten (rKH) wurde die „Verzuckerungsleistung“ der einzelnen Behandlungsmethoden ermittelt (Abb. 4-31).

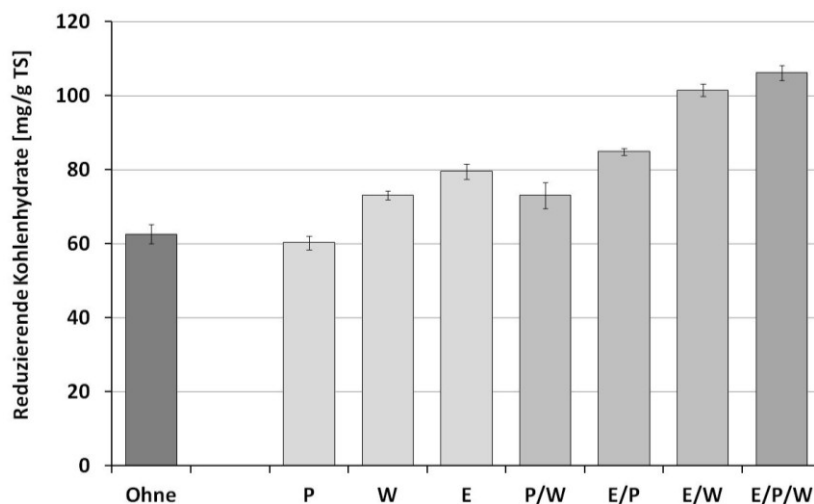


Abb. 4-31: Gemittelter Gehalt an reduzierenden Kohlenhydraten der nicht behandelten und vorbehandelten Roggensilagen des Erntejahres 2007 mit einer Häcksellänge von 8 mm nach einer 24-stündigen Vorhydrolyse

Tab. 4-10: Zu- oder Abnahme der reduzierenden Kohlenhydrate durch unterschiedliche Vorbehandlungen der Roggensilage des Erntejahres 2007 mit einer Häcksellänge von 8 mm bei einer 24-stündigen Vorhydrolyse

Differenz [%]	
RS 8 mm	Basis
P	-3,7 ^{n.s.}
W	+17 ^{n.s.}
E	+27 ^{n.s.}
P/W	+17 ^{n.s.}
E/P	+36 [*]
E/W	+62 ^{**}
W/E/P	+70 ^{**}

Ohne = unbehandelte Silage, P = Pasteurisieren: 90 °C, 1 bar, 20 Minuten; E = Enzym: A3 + B4, 1 kg je Enzym/t TS Roggen; W = Wasser: 350 g Silage + 350 g Wasser; RS = Roggensilage, * $p < 0,05$ (Dunnett-Test), ** $p < 0,01$ (Dunnett-Test), n.s. = nicht signifikant

²⁰Celluclast® (Cellulase) + Viscozyme® (Hemicellulase, Pektinase)

Das Pasteurisieren von Roggensilage führte zu einer minimalen Abnahme an rKH. Aufgrund der hohen Temperaturen während der Pasteurisierung ist die Minderung auf Maillard-Reaktionen von rKH und Aminosäuren unter Bildung von z. B. Dicarbonylverbindungen und Melanoidinen oder auf die Bildung von Furfuralen durch säurekatalytische Dehydratisierung von Pentosen bzw. Hexosen zurückzuführen. Ein Wasserzusatz erhöhte die Kohlenhydratausbeute um 17 %. Wurde die Roggensilage vor dem Wasserzusatz pasteurisiert, konnte keine weitere Steigerung an rKH gemessen werden. Die Differenz an rKH zur Kontrollvariante blieb unverändert bei 17 % (Tab. 4-10). Mit dem Zusatz einer Enzymmischung zur Roggensilage wurde eine Zunahme an rKH von 27 % nachgewiesen. Wurde pasteurisierte Roggensilage für die enzymatische Behandlung verwendet, konnte die Ausbeute an rKH um weitere 9 % auf 36 % ($p < 0,05$) gesteigert werden. Verursacht dadurch, dass die Stoffwechselvorgänge der Mikroorganismen durch ein Pasteurisieren zum Erliegen kommen und folglich die durch das Enzympräparat freigesetzten rKH während der sich anschließenden 24-stündigen Behandlung nicht durch die epiphytische Bakterienpopulation metabolisiert werden. Somit war der Enzymeffekt hinsichtlich einer 24-stündigen Vorbehandlung von Roggensilage nachweisbar. Analoge Ergebnisse erzielten Wang *et al.* [2002] unter Einsatz von Maissilage und einer Mischung aus Xylanase und β -Glucanase (*Trichoderma longibrachiatum*). Durch ein Autoklavieren (121 °C, 20 min) der Silage vor der 24-stündigen enzymatischen Behandlung erhöhte sich die Ausbeute an rKH verglichen mit der nicht autoklavierten Variante mit Enzymapplikation.

Eine Kombination aus Wasser- und Enzymbehandlung hatte synergistische Effekte zur Folge und resultierte in einer signifikanten Steigerung der rKH von 62 % ($p < 0,01$). Wurde der Metabolismus der in der Roggensilage enthaltenen Mikroorganismen durch ein Pasteurisieren unterbunden, konnte durch eine Wasser- und Enzymgabe die höchste signifikante Steigerung an niedermolekularen Kohlenhydraten bzw. Folgeprodukten von 70 % ($p < 0,01$) gemessen werden. Das entspricht einer Zunahme durch das Pasteurisieren von 8 %.

4.7.3 Abbauverhalten der Lignocellulose

Wurde die nicht pasteurisierte Roggensilage ohne Additive nach einer 24-stündigen Behandlung untersucht, so ergaben sich geringfügige Änderungen in der chemischen Zusammensetzung²¹. Die Trockensubstanz und organische Trockensubstanz nahmen um 2 % und der Gehalt an Hemicellulose um 3 % ab. Eine Zunahme um 2 % war bei der Konzentration der WSC zu messen. Das Pasteurisieren bewirkte, im Vergleich mit der unbehandelten Variante, einen gesteigerten Abbau an Lignocellulose sowie eine gesteigerte Zunahme an wasserlöslichen Kohlenhydraten (Tab.

²¹Analyseergebnisse siehe Anhang 8.2

4-11). Im Gegensatz zur Messung der reduzierenden Kohlenhydrate war durch Ermittlung der wasserlöslichen Kohlenhydrate eine Steigerung an Kohlenhydraten nachweisbar. Der Unterschied ergab sich vermutlich durch die Anwendung unterschiedlicher Methoden.

Tab. 4-11: Abbaugrad (Mittelwerte) der Trockensubstanz TS, organischen Trockensubstanz oTS, Cellulose, Hemicellulose und des Lignins sowie Zunahme (Mittelwerte) der wasserlöslichen Kohlenhydrate WSC von den direkt vor dem Biogasprozess nicht behandelten und vorbehandelten Roggensilagen des Erntejahres 2007 mit einer Häcksellänge von 8 mm

	Abbau [%]					Zunahme [%]
	TS	oTS	Cellulose	Hemicellulose	Lignin	WSC
	[%]					
Roggensilage 8 mm	2	2	0	3	0	2
Roggensilage + P	2	2	7	3	3	24
Roggensilage + W	0	0	2	0	4	18
Roggensilage + E	1	1	4	0	3	69
Roggensilage + P/W	0	0	3	11	9	18
Roggensilage + P/E	1	2	3	15	0	144
Roggensilage + W/E	0	0	0	1	0	97
Roggensilage + P/W/E	1	1	2	9	5	201

P = Pasteurisieren: 90 °C, 1 bar, 20 Minuten; E = Enzym: A3 + B4, 1 kg je Enzym /t TS Roggen; W = Wasser: 350 g Silage + 350 g Wasser

Mittels Wasser- oder Enzymzusatz wurde ein geringer Teil der Cellulose sowie des Lignins unter Freisetzung von WSC abgebaut. Wurden die Methoden kombiniert, war ein sehr geringer Hemicelluloseabbau messbar. Eine synergistische Wirkung wurde, gleich den Analysenergebnissen in Abschnitt 4.7.2, bezüglich der Freisetzung an WSC nachgewiesen.

Lag die Roggensilage in einem pasteurisierten Zustand vor, wirkte sich ein Wasser- oder Enzymzusatz positiv auf den Abbau von Lignocellulose aus. Durch einen Enzymzusatz zur pasteurisierten Silage konnte der höchste Hemicelluloseabbau, verglichen mit den hergestellten Silagen, von 15 % erzielt werden. Der Gehalt an WSC nahm um 144 % zu. Ein Wasserzusatz zur pasteurisierten Roggensilage zeigte, gleich den Angaben bezüglich der reduzierenden Kohlenhydrate in Abschnitt 4.7.2., keine synergistische Wirkung bei der Freisetzung an WSC. Die genannte Silage wies den höchsten Abbau an Lignin von 9 % auf.

Wurde die pasteurisierte und mit Enzym versetzte Roggensilage zusätzlich gewässert, stieg der Gehalt an WSC insgesamt um 201 %. Hinsichtlich des Abbaus an Lignocellulose wurde keine synergistische Wirkung bei gleichzeitigem Zusatz von Enzymen und Wasser zur pasteurisierten Roggensilage gemessen.

Untersuchungen von Wang *et al.* [2002] bestätigen die Annahme, dass unter Anwendung von thermisch behandelten Silagen ein höherer Abbau an Faserstoffen, verglichen mit nicht thermisch behandelten Silagen, messbar ist. Bei 121 °C für 20 Minuten autoklavierte Gersten-

bzw. Maissilage zeigte nach einer 24-stündigen Behandlung mit einer Mischung aus Xylanase und β -Glucanase (*Trichoderma longibrachiatum*) eine signifikante Reduktion der NDF-Fraktion von 5 bzw. 12 %. Ohne eine Vorbehandlung durch Erhitzen konnte eine Abnahme an Gerüstsubstanzen von rund 1 % gemessen werden. Auch bei der Behandlung von Weizenstroh mit *Pleurotus sajorcaju* erwies sich ein Pasteurisieren bei 90 °C für 3 Stunden zur Steigerung der *in vitro* Verdaulichkeit der Trockenmasse als vorteilhaft [Kuhad & Singh, 2007]. Die höchsten Abbauraten an Hemicellulose, welche über denen der Cellulose und des Lignins liegen, wurden bei den pasteurisierten, mit Enzym oder/und Wasser behandelten Roggensilagen, im Vergleich mit den nicht pasteurisierten und enzymatisch oder mit Wasser behandelten Roggensilagen, nachgewiesen. Hendriks & Zeeman [2009] gaben in einem Review über Vorbehandlungen zur Erhöhung der Abbaubarkeit von Lignocellulose an, dass die Löslichkeit der Hemicellulose mit steigender Temperatur zunimmt. Für Prozesse mit Temperaturen von über 150 °C wurde zudem angegeben, dass thermisch induzierte Strukturänderungen sich anfänglich in einem Hemicelluloseabbau äußern. Hemicellulose ist generell sensibel gegenüber thermischen und chemischen Behandlungen.

4.7.4 Einfluss des Enzymzusatzes auf die Silagequalität

Der pH-Wert der Roggensilagen blieb nach der 24-stündigen Behandlung unverändert bei 3,8. Von den durchgeführten Behandlungsmethoden unbeeinflusst blieben weiterhin die Gehalte an Ammoniak und Alkohol²². Wang *et al.* [2002] konnten ebenso keine signifikanten Änderungen nachweisen.

Aufgrund der Tatsache, dass die für die DLG-Bewertung zur Qualitätsermittlung herangezogenen Parameter wie Buttersäure, Essigsäure und der pH-Wert nach den Vorbehandlungen unverändert blieben, kann von einer sehr guten Silagequalität ausgegangen werden.

4.8 Enzymatische Behandlung der Silagen während des Biogasprozesses

4.8.1 Abbauverhalten der Lignocellulose

Die Enzymwirkung wurde bei den während des Biogasprozesses enzymatisch behandelten Mais- und Roggensilagen anhand der Biogas- und Methanausbeuten (Abschnitt 4.9.2.4) und den Abbaugraden ausgewählter Inhaltsstoffe erfasst.

Die durch den Enzymeinsatz erzielten Effekte bezüglich der Trockensubstanz, organischen Trockensubstanz sowie Lignocellulose sind in Tab. 4-12 und Tab. 4-13 dargestellt. Dem

²²Analyseergebnisse siehe Anhang 8.2

Anhang 8.2 sind die zur Berechnung der Abbaugrade herangezogenen Analysenwerte der Substrate, Inokula und Gärrückstände zu entnehmen.

Der Abbau an Trockensubstanz und organischer Trockensubstanz lag bei den unbehandelten Mais- bzw. Roggensilagen mit einer Häcksellänge von 4 mm, im Vergleich zu denen mit einer Länge von 8 mm, höher.

Die organische Trockensubstanz wurde bei den im Batch-Gärtest eingesetzten Maissilagen zwischen 63 und 88 % abgebaut. Aufgrund höherer Gehalte an strukturgebenden Verbindungen wiesen die Roggensilagen einen geringeren Abbaugrad an organischer Substanz von 30 bis 71 % auf. Reinhold [2005] gab für landwirtschaftliche Biogasanlagen mit Mais- bzw. Ganzpflanzensilage als Ausgangssubstrat, welche einen Gehalt an Trockensubstanz von 32 bzw. 40 % aufweisen, vergleichbare Abbauraten für die organische Trockenmasse von 70 bzw. 60 % an.

Maissilage 2006

In Bezug auf die Parameter Hemicellulose und Lignin können nur bedingt Aussagen getroffen werden. Teilweise waren keine Berechnungen für die Gehalte an Hemicellulose und/oder Lignin und folglich für die Abbaugrade möglich²³.

Tab. 4-12: Abbaugrad (Mittelwerte) der Trockensubstanz TS, organischen Trockensubstanz oTS, Cellulose, Hemicellulose und des Lignins von den während des Biogasprozesses nicht behandelten und vorbehandelten Maissilagen des Erntejahres 2006 mit variierenden Häcksellängen

	Abbau [%]				
	TS	oTS	Cellulose	Hemicellulose	Lignin
Maissilage 4 mm	82	83	80	53	-
Maissilage + A1/B1	84	82	53	-	-
Maissilage + A1/L	88	88	84	58	-
Maissilage + B1/L	53	66	61	63	0
Maissilage 8 mm	65	69	73	-	-
Maissilage + A1	82	80	61	-	69
Maissilage + B1	63	73	68	99	0
Maissilage + L	89	87	81	81	-
Maissilage + A1/B1	67	73	84	75	21
Maissilage + A1/L	54	67	70	23	-
Maissilage + B1/L	71	79	78	52	-
Maissilage + A1/B1/L	49	63	87	38	-

A1 = Cellulase, B1 = Pektinase, L = Laccase

²³Das Inokulum enthielt nach dem Gärtest, verglichen mit der Mischung aus Inokulum und Substrat, eine höhere Konzentration an Hemicellulose und/oder Lignin. Folglich wurden negative Werte für die Gehalte an Hemicellulose und/oder Lignin im Substrat berechnet. Die Abbaugrade lagen daher über 100 %.

Für den Celluloseabbau lassen sich die folgenden Aussagen treffen:

Werden die Ergebnisse der unbehandelten Maissilagen unterschiedlicher Häcksellänge verglichen, so konnte ein höherer Abbau an Cellulose bei der 4 mm Variante nachgewiesen werden. Bei der Maissilage mit einer Häcksellänge von 4 mm und dem Zusatz einer Mischung aus Cellulase und Laccase wurde der höchste Abbau an organischer Substanz und Cellulose von 88 bzw. 84 %, verglichen mit den hergestellten Silagen mit einer Häcksellänge von 4 mm, ermittelt.

Bei den Varianten mit einer Partikelgröße von 8 mm konnte eine Steigerung des Abbaus an Lignocellulose hauptsächlich durch Enzymmischungen erzielt werden. Hervorzuheben ist die Variante mit einer Mischung aus Cellulase und Pektinase oder Cellulase, Pektinase und Laccase. Der höchste Celluloseabbau war unter Dotierung einer Dreifachmischung in Höhe von 87 % zu messen. Das entsprach einer Steigerung der Abbaurate gegenüber der Kontrollvariante von 14 Prozentpunkten.

Roggensilage 2006

Im Gegensatz zur Maissilage konnte beim Vergleich des Celluloseabbaus der 4 bzw. 8 mm langen, unbehandelten Häcksel nachgewiesen werden, dass ein höherer Abbau beim Einsatz von 8 mm langen Häckseln stattfand.

Tab. 4-13: Abbaugrad (Mittelwerte) der Trockensubstanz TS, organischen Trockensubstanz oTS, Cellulose, Hemicellulose und des Lignins von den während des Biogasprozesses nicht behandelten und vorbehandelten Roggensilagen des Erntejahres 2006 mit variierenden Häcksellängen

	Abbau [%]				
	TS	oTS	Cellulose	Hemicellulose	Lignin
Roggensilage 4 mm	48	57	73	74	0
Roggensilage + A1/B1	35	48	78	45	0
Roggensilage + A1/L	31	46	79	75	0
Roggensilage + B1/L	60	68	75	89	6
Roggensilage 8 mm	29	42	82	39	0
Roggensilage + A1	70	71	77	-	0
Roggensilage + B1	41	46	70	47	0
Roggensilage + L	50	58	76	0	54
Roggensilage + A1/B1	11	30	72	2	0
Roggensilage + A1/L	48	57	59	78	15
Roggensilage + B1/L	61	61	88	0	86
Roggensilage + A1/B1/L	32	45	62	39	0

A1 = Cellulase, B1 = Pektinase, L = Laccase

Ein Enzymzusatz in Form von Mischungen aus zwei Enzympräparaten führte bei der Roggensilage mit einer Häcksellänge von 4 mm zu einem gesteigerten Celluloseabbau. Dieser stieg am

stärksten bei einer Dotierung von Cellulase und Laccase an. Der Abbau nahm um 6 Prozentpunkte zu. Ein um 2 Prozentpunkte gesteigener Celluloseabbau sowie die höchsten Abbauraten in Bezug auf die organische Trockensubstanz, die Hemicellulose und das Lignin war bei der Roggensilage mit einem Zusatz an Pektinase und Laccase zu messen.

Hinsichtlich der Roggensilagen mit einer Häcksellänge von 8 mm konnte ein gegenüber der Kontrollvariante erhöhter Celluloseabbau durch die Dotierung von Pektinase und Laccase erzielt werden. Der Abbau lag um 6 Prozentpunkte über dem der Kontrolle.

In den wenigen wissenschaftlichen Berichten zum Abbau von Lignocellulose bei einer enzymatischen Behandlung von Energiepflanzen während des Biogasprozesses waren die Ergebnisse konträr. So ermittelte Kaiser [2004] unter ausgewählten Bedingungen einen verstärkten Abbau der ADF-Fraktion, bestehend aus Cellulose und Lignin, durch den Zusatz einer Enzymmischung aus β -Glucanase, Xylanase und Cellulase bei der mesophilen Vergärung von Mais-silage. Die Höhe der Abbaurate ist nicht bekannt. Die Arbeiten von Lebuhn *et al.* [2010] zeigten, dass unter Anwendung von Maissilage und Enzymmischungen im mesophilen Prozess kein verbesserter Abbau an Lignocellulose festgestellt werden konnte. Im Hinblick auf die Roggensilage ist eine Arbeit bekannt, in welcher eine Stoffgruppenanalyse nach van Soest vor sowie nach einer mesophilen Vergärung von 21 Tagen im Labormaßstab durchgeführt wurde. Die prozentualen Abbauraten der organischen Trockensubstanz sowie der Cellulose und Hemicellulose zeigten, dass der Umsatz der Biomasse bzw. Lignocellulose durch den Einsatz der gewählten Enzymmischungen sowie der gewählten Versuchsbedingungen nicht verstärkt werden konnte. [Schuhmann, 2007] Im Gegensatz dazu war es möglich, mit vereinzelt, in dieser Arbeit gewählten Enzympräparaten oder -mischungen, den Abbau an organischer Substanz und der Lignocellulose zu steigern. Die Ursache wird in der Anwendung von Enzympräparaten oder -mischungen anderen Ursprungs und anderer Zusammensetzung gesehen.

4.9 Eudiometer-Gärtests

4.9.1 Inokulum

4.9.1.1 Chemische Zusammensetzung des Inokulums

Insgesamt wurden 13 Versuche zur Biogaspotenzialbestimmung durchgeführt, somit standen 13 Inokula bzw. Faulschlämme zum Vergleich zur Verfügung.

In der Tab. 4-14 ist eine Übersicht über die Zusammensetzung²⁴ der in den experimentellen Arbeiten verwendeten Faulschlämme und die während des Biogasprozesses zu verzeichnenden Abbauraten²⁴ wiedergegeben.

Tab. 4-14: Chemische Zusammensetzung der verwendeten Faulschlämme vor sowie nach dem Batch-Gärtest und Abbaugrad ausgewählter Parameter (MW = Mittelwerte); n = 13

		Faulschlamm Input Min - Max	MW	Faulschlamm Output Min - Max	MW	Abbaugrad [%] Min - Max	MW
TS	[%]	2,63 - 4,27	3,30	2,12 - 2,95	2,50	16 - 31	22
oTS	[% i.TS]	46,06 - 66,19	60,34	50,23 - 60,87	55,92	23 - 42	29
XA	[% i.TS]	36,20 - 53,03	44,92	41,78 - 52,31	46,89	3 - 30	17
XP	[% i.TS]	26,93 - 50,57	40,16	22,29 - 54,24	35,98	10 - 56	38
XL	[% i.TS]	1,01 - 2,71	1,95	1,10 - 2,24	1,75	11 - 57	35
XF	[% i.TS]	4,48 - 12,16	7,06	2,82 - 13,48	8,62	0 - 51	20
NDF	[% i.TS]	8,95 - 15,63	12,76	8,32 - 13,57	11,72	1 - 52	29
ADF	[% i.TS]	3,31 - 11,41	8,40	7,09 - 12,11	9,38	0 - 34	14
ADL	[% i.TS]	3,98 - 7,24	5,48	5,37 - 8,56	6,36	0 - 35	11
Cellulose	[% i.TS]	2,24 - 4,18	3,30	1,56 - 3,98	3,02	4 - 46	26
Hemicellulose	[% i.TS]	0 - 7,25	4,91	0,54 - 5,19	2,02	0 - 93	66
WSC	[% i.TS]	0 - 0,19	0,07	0 - 0,20	0,07	0	0
NO ₃	[% i.TS]	0 - 0,05	0,02	0 - 0,04	0,02	0 - 26	9
NH ₄ -N	[% i.TS]	0,73 - 3,75	2,52	0,68 - 5,19	2,31	0 - 80	43
C	[% i.TS]	28,65 - 37,62	33,81	29,15	29,15	24	24
N	[% i.TS]	4,38 - 6,76	5,67	4,79	4,79	30	30
S	[% i.TS]	1,59 - 2,36	1,90	1,58	1,58	20	20
C/N-Verhältnis		5 - 7	6	-	-	-	-
pH-Wert		7,07 - 7,80	7,36	7,23-7,79	7,48	-	-

TS = Trockensubstanz, oTS = Organische Trockensubstanz, XA = Rohasche, XP = Rohprotein, XL = Rohfett, XF = Rohfaser, NDF = Neutral Detergent Fiber, ADF = Acid Detergent Fiber, ADL = Acid Detergent Lignin, WSC = Wasserlösliche Kohlenhydrate, NO₃ = Nitrat, NH₄-N = Ammonium-Stickstoff, C = Kohlenstoff, N = Stickstoff, S = Schwefel, Min = Minimum, Max = Maximum

Die eingesetzten Faulschlämme wiesen insgesamt stark variierende Konzentrationen bezüglich der ermittelten Inhaltsstoffe auf. Grund der Schwankungen, welche sich auf die Zusammensetzung der Gärprodukte und die Höhe des Abbaugrades auswirken, ist vermutlich die schwankende Zusammensetzung der in den Kläranlagen zu behandelnden Abwässer. Damit verbunden sind divergente Abbaugrade der Abwasserinhaltsstoffe und demnach unterschiedliche Biomassezuwächse. Dies wirkt sich wiederum auf die Stoffwechselvorgänge der anaeroben Bakterienstämme aus, welche die Biomasse während einer anaeroben Konversion zu Faulschlamm unter Bildung von Faulgasen umsetzen. Als sehr gut ausgefault und stabil werden im technischen Sinne Schlämme mit einem Gehalt an Rohasche von 50 % bezeichnet. Die in dieser Arbeit verwendeten Faulschlämme wiesen im Mittel einen Rohaschegehalt von 45 % auf. Im

²⁴Analyseergebnisse und Abbaugrade der einzelnen Faulschlämme siehe Anhang 8.2

Prozess der Schlammfäulung wird der Anteil an organischer Substanz auf rund 50 % vermindert; die verbleibende organische Substanz ist schwer abbaubar. In den untersuchten Faulschlämmen wurden Gehalte an organischer Substanz von 46 bis 66 % ermittelt. Die Werte entsprechen den notwendigen technischen Anforderungen. Es konnte von reproduzierbaren Faulschlämmen ausgegangen werden.

Weiterhin wurden die Gehalte ausgewählter Mineralstoffe und Schwermetalle und demzufolge das Inhibierungspotenzial (Abschnitt 2.4.1) zweier ausgewählter Faulschlämme gemessen (Tab. 4-15). Nach den von der FNR [2010] beschriebenen Hemmkonzentrationen für Mineralstoffe und Schwermetalle im Biogasprozess waren keine inhibierenden Wirkungen zu erwarten.

Tab. 4-15: Gemittelte Gehalte einzelner Mineralstoffe und Schwermetalle in ausgewählten Faulschlämmen

Parameter	Einheit	Faulschlamm Juli 2007	s	Faulschlamm Oktober 2007	s
Mineralstoffe					
Calcium	g/kg TS	40,01	0,89	39,52	1,61
Kalium	g/kg TS	12,11	0,10	10,55	0,04
Magnesium	g/kg TS	4,76	0,02	4,86	0,05
Phosphor	g/kg TS	30,75	0,82	31,58	1,98
Schwermetalle					
Blei	mg/kg TS	89,76	0,77	61,19	1,49
Cadmium	mg/kg TS	<1	-	<1	-
Chrom	mg/kg TS	28,91	2,08	33,71	0,95
Eisen	g/kg TS	2,61	0,04	2,61	0,03
Kupfer	mg/kg TS	858,27	5,85	858,80	0,28
Nickel	mg/kg TS	27,01	0,69	29,06	0,61
Zink	mg/kg TS	857,61	13,32	802,68	10,83

s = Standardabweichung

4.9.1.2 Vergleich der spezifischen Methanerträge der Inokula

Der Methanertrag der untersuchten Inokula variierte zwischen 147 und 328 m³/t oTS (Abb. 4-32). Der Mittelwert bzw. der Varianzkoeffizient lag bei 218 ± 59 m³/t oTS bzw. 26,9 %. Zwischen dem Gehalt an organischer Substanz und dem Methanertrag wurde eine nicht signifikante, mittelstarke Korrelation von 0,582 ermittelt.

Bezüglich der ersten und dritten Faulschlammentnahme ist anzumerken, dass lediglich die Biogasausbeute der genannten Inokula bestimmt wurde. Der im Oktober 2007 entnommene Faulschlamm diente ausschließlich zu Versuchszwecken (Daten nicht dargestellt), welche in Kooperation mit der Universität Hohenheim durchgeführt und demnach nicht mit den Versuchsaapparaturen, welche zur Bestimmung der Biogaspotenziale dieser Arbeit dienten, untersucht wurden.

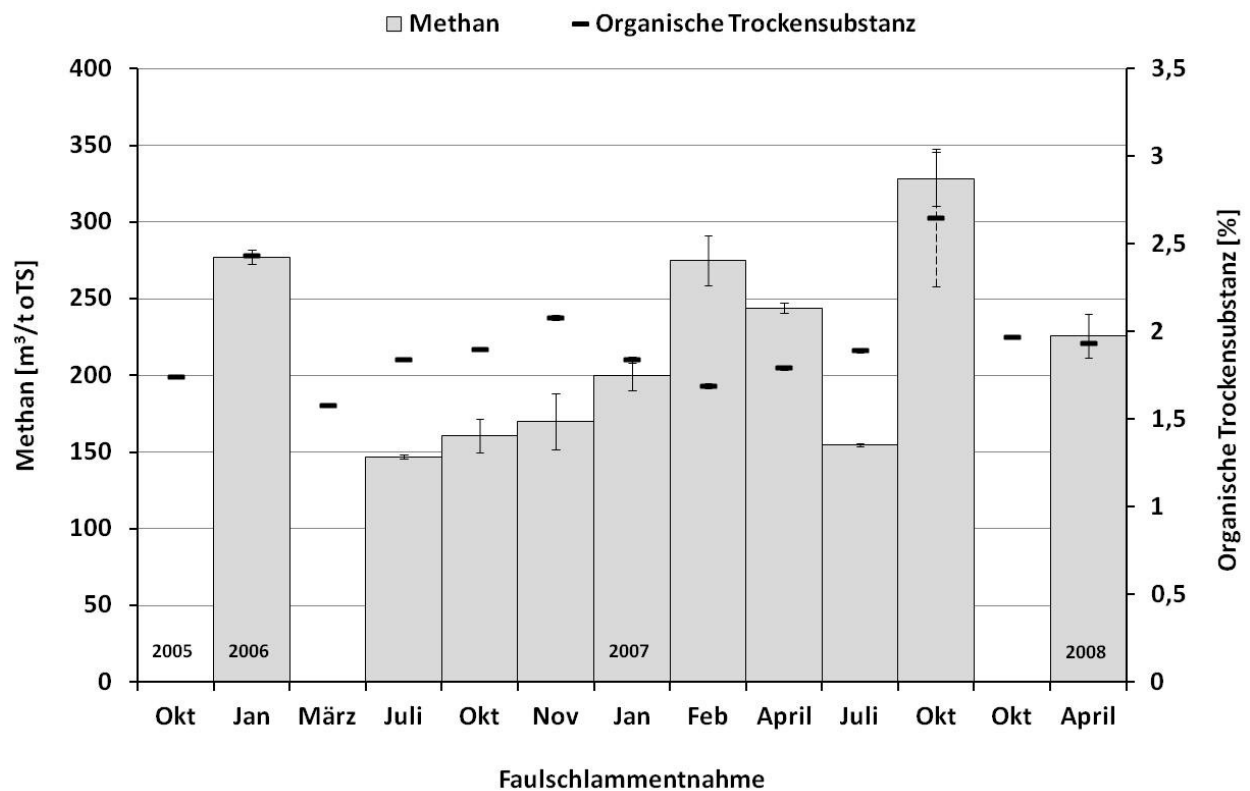


Abb. 4-32: Gemittelte Gehalte an organischer Trockensubstanz und spezifische Methanerträge (Mittelwerte) der eingesetzten Faulschlämme; n = 13

Der Abb. 4-32 kann entnommen werden, dass die organische Trockensubstanz und die Methanerträge jahreszeitlichen Schwankungen unterliegen. Tendenziell wurden im Herbst bzw. Winter höhere Feststoffgehalte und Methanerträge gemessen als im Frühling bzw. Sommer.

4.9.2 Gärsubstrate

4.9.2.1 Spezifische Biogas- und Methanerträge der Rohstoffe

Um den Effekt der Silierung auf die Methanausbeuten der eingesetzten Energiepflanzen zu ermitteln, wurden die spezifischen Biogas- und Methanerträge (Abschnitt 3.3.5) der verwendeten Rohstoffe bestimmt (Tab. 4-16).

Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, dass die Biogasausbeuten der Substrate mit einer Häcksel­länge von 8 mm im Vergleich mit den Substraten mit einer Länge von 4 mm, geringer ausfallen, im Falle der Varianten des Erntejahres 2006 in signifikantem Maße. Signifikante Differenzen wurden im Hinblick auf die Methanausbeuten bei dem Vergleich der Ausbeuten der unterschiedlich gehäckselten Roggen des Jahres 2006 nachgewiesen. Die Variante mit einer Häcksel­länge von 4 mm wies einen signifikant höheren Methanertrag auf. Das kürzere Partikellängen steigende Methanausbeuten bei frischem Siliergut bedingen, konnte bereits von Herrmann [2010] nachgewiesen werden.

Tab. 4-16: Spezifische Biogas- und Methanerträge (Mittelwerte \pm Standardabweichungen) und mittlere Methangehalte der eingesetzten Rohstoffe Mais und Roggen sowie die Differenzen zwischen den spezifischen Methanerträgen der Rohstoffe eines Erntejahres mit unterschiedlicher Häcksellänge

	n	Biogas	Methan	Methangehalt	Differenz
		[m ³ /t oTS]	[m ³ /t oTS]	[Vol.-%]	[%]
Mais 2005					
4 mm	2	496 \pm 31 ^{n.s.}	-	-	-
8 mm	2	484 \pm 0	-	-	-
Mais 2006					
4 mm	3	474 \pm 12 [*]	296 \pm 9 ^{n.s.}	62,5	+9,6
8 mm	2	418 \pm 10	270 \pm 5	64,4	0
Roggen 2006					
4 mm	3	380 \pm 4 [*]	243 \pm 4 ^{**}	65,1	+8,0
8 mm	3	367 \pm 3	225 \pm 2	62,7	0
Roggen 2007					
8 mm	3	439 \pm 2	249 \pm 3	56,6	-

n.s. = nicht signifikant, *p < 0,05 (Dunnett-Test), **p < 0,01 (Dunnett-Test), n = Probenanzahl (Eudiometerrohre)

Die Biogasausbeuten lagen unabhängig vom Häckselgrad für Mais bzw. Roggen bei 418 bis 496 m³/t oTS bzw. 367 bis 439 m³/t oTS. Wurde unter Einbezug der Methangehalte die Methanausbeute bestimmt, ergaben sich für Mais bzw. Roggen Werte von 270 und 296 m³/t oTS bzw. 225 bis 249 m³/t oTS. Mukengele & Oechsner [2007] erzielten im Vergleich zu den in dieser Arbeit gemessenen Werten höhere Methanerträge für Mais von 345 bis 351 m³/t oTS. Untersuchungen von Herrmann *et al.* [2011] zeigten einen Wert für Mais bzw. Roggen von 330 bzw. 293 m³/t oTS. Eine geringere Methanausbeute von 225 m³/t oTS konnten Amon *et al.* [2007a] für Mais ermitteln. Die in dieser Arbeit erzielten Ausbeuten liegen im mittleren Bereich der Literaturwerte.

4.9.2.2 Spezifische Biogas- und Methanerträge der während der Silierung enzymatisch behandelten Silagen

Hinsichtlich des Einsatzes von Enzymen während der Silierung zur Steigerung der Methanausbeute sind während der Durchführung dieser Arbeit zwei wissenschaftliche Berichte bekannt geworden. Von Neureiter *et al.* [2005] wurde das kommerzielle Enzympräparat Termamyl LC^{®25} (Novozymes A/S) zur enzymatischen Behandlung von Mais mit einer Trockensubstanz von 35,59 % eingesetzt. Die zugesetzte Menge an Enzym lag bei 0,45 g/kg Frischmasse. Unter Enzymzusatz konnte die Ausbeute an Methan bei einer mesophilen Vergärung nach 44 d signifikant (p<0,05) gesteigert werden. Wurde die Verweilzeit der Konservierung auf 119 d verlängert, ergab sich eine der Kontrollvariante vergleichbare Methanausbeute. Als eine Ursache für die

²⁵Termamyl LC[®] - Amylase (*Bacillus licheniformis*)

Veränderung der Methanausbeute war die Zunahme an Massenverlusten mit der Zeit angegeben worden. Eine stoffliche Bilanzierung anhand der Faserstoffkonzentrationen wurde nicht durchgeführt. Lehtomäki [2006] verwendete zur Vorbehandlung von Gras und Zuckerrübenblättern eine 1 %-ige Enzymmischung aus zwei Cellulasen und zwei Xylanasen (IndiAge MAX L, Primafast 200, GC 320, Multifect; *Trichoderma reesei*). Diese wurde dem Substrat vor der Silierung in einem Verhältnis zum Pflanzenmaterial von 0,01 % (v/w) zugesetzt. Nach einer Konservierung von 3 bzw. 6 Monaten konnte das silierte Material unter mesophilen Bedingungen methanisiert werden. Das Additiv zeigte beim Einsatz von Zuckerrübenblättern keine ertragssteigernde Wirkung. Gegensätzlich dazu waren mit Gras deutliche Unterschiede in den Methanausbeuten zwischen der nicht enzymatisch behandelten und der mit Enzym versetzten Probe zu messen. Der Methanertrag wurde positiv beeinflusst und somit das Methanbildungspotenzial in stärkerem Maße unter Enzymeinsatz konserviert.

Demnach wurde erstmalig im Rahmen eigener experimenteller Arbeiten grundlegend der Einsatz von Cellulasen, Pektinasen und Laccasen während der Silierung von Mais und Roggen mit dem Ziel der Effizienzsteigerung im Biogasprozess geprüft.

Wenige aktuelle Arbeiten beschäftigten sich mit der Dotierung von Mischungen aus Enzymen und Mikroorganismen. Das heißt, dass Enzympräparate zum Abbau von Gerüstsubstanzen und übliche Silierhilfsmittel, welche Mikroorganismen zur Milchsäurebildung enthalten, kombiniert und während der Silierung eingesetzt wurden. Mit dem Produkt Josilac^{®26} [Pakarinen *et al.* 2008] bzw. Sil-All 4x4^{®27} [Vervaeren *et al.* 2010] waren allerdings nur nicht signifikante Ertragssteigerungen von 5 % bzw. -3 % bis 8 % zu erzielen. Zum Einsatz kamen in Laborversuchen unter mesophilen Bedingungen Mais bzw. verschiedene Grasarten.

Die enzymatische Behandlung von Mais und Roggen unterschiedlicher Erntejahre vor der Silierung zeigte in Abhängigkeit von der Substratart und -zusammensetzung sowie vom Enzympräparat und dessen Konzentration unterschiedliche Ergebnisse bei der Methanisierung. Die Tab. 4-17 gibt einen Überblick über die erlangten Werte. Es werden die gemittelten spezifischen Biogas- und Methanausbeuten bezogen auf die organische Trockensubstanz ($\text{m}^3/\text{t oTS}$) und die durchschnittlichen spezifischen Methanausbeuten, bezogen auf die Frischmasse an eingesetztem Mais oder Roggen vor der Silierung ($\text{m}^3/\text{t FM}$), d. h. unter Berücksichtigung der Massenverluste während der Silierung, dargestellt. Zudem können der Tab. 4-17 die mittleren Methangehalte sowie die Leistungssteigerungen durch den Enzymeinsatz (Differenz, DI) entnommen werden.

²⁶Josilac[®] - Cellulase, Pektinase, Xylanase + *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*

²⁷Sil-All 4x4[®] - α -Amylase, Cellulase, Hemicellulase, Pentosanase + *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus salivarius*

Tab. 4-17: Spezifische Biogas- und Methanerträge (Mittelwerte \pm Standardabweichungen), mittlere Methan-gehalte und Differenzen DI aus den Biogas- und Methanerträgen der während der Silierung unbehandelten und enzymatisch behandelten Mais- und Roggensilagen unterschiedlicher Erntejahre und Häcksellänge

	n	Biogas		Methan				
		Ertrag	DI	Anteil	Ertrag	DI	Ertrag	DI
		[m³/t oTS]	[%]	[Vol.-%]	[m³/t oTS]	[%]	[m³/t FM]	[%]
Erntejahr 2005								
Maissilage 4 mm	3	477 ± 50	0	55,1	267 ± 33	0	88 ± 9	0
Maissilage + B3	3	453 ± 31 ^{n.s.}	-5	62,7	300 ± 22 ^{n.s.}	+12	91 ± 5 ^{n.s.}	+3
Maissilage + B4	3	388 ± 32 ^{n.s.}	-19	66,7	262 ± 24 ^{n.s.}	-2	70 ± 5 [*]	-21
Maissilage + B3/B4	3	357 ± 18 [*]	-25	73,2	283 ± 15 ^{n.s.}	+6	75 ± 3 ^{n.s.}	-15
Maissilage 8 mm	3	382 ± 75	0	67,8	262 ± 57	0	95 ± 17	0
Maissilage + B3	3	442 ± 23 ^{n.s.}	+16	71,0	329 ± 18 ^{n.s.}	+26	103 ± 5 ^{n.s.}	+9
Maissilage + B4	3	486 ± 34 ^{n.s.}	+27	71,7	350 ± 27 [*]	+34	112 ± 7 ^{n.s.}	+18
Maissilage + B3/B4	3	450 ± 16 ^{n.s.}	+18	76,6	357 ± 14 [*]	+36	107 ± 3 ^{n.s.}	+13
Erntejahr 2006								
Roggensilage 4 mm	2	354 ± 1	0	60,1	213 ± 7	0	87 ± 3	0
Roggensilage + A3/B4	2	381 ± 7 [*]	+8	60,1	229 ± 4 ^{n.s.}	+8	91 ± 2 ^{n.s.}	+4
Roggensilage + A3/L	2	375 ± 1 [*]	+6	59,7	220 ± 13 ^{n.s.}	+3	88 ± 5 ^{n.s.}	+1
Roggensilage + B4/L	2	370 ± 0 ^{n.s.}	+5	60,8	225 ± 0 ^{n.s.}	+6	90 ± 0 ^{n.s.}	+3
Roggensilage 8 mm	2	360 ± 8	0	61,7	222 ± 5	0	91 ± 2	0
Roggensilage + A3	2	361 ± 9 ^{n.s.}	0	60,4	218 ± 6 ^{n.s.}	-2	88 ± 2 ^{n.s.}	-3
Roggensilage + B4	2	380 ± 19 ^{n.s.}	+6	57,7	219 ± 13 ^{n.s.}	-1	89 ± 5 ^{n.s.}	-3
Roggensilage + L	2	400 ± 28 ^{n.s.}	+11	56,7	227 ± 8 ^{n.s.}	+2	93 ± 3 ^{n.s.}	+2
Roggensilage + A3/B4	2	376 ± 14 ^{n.s.}	+4	66,9	252 ± 10 [*]	+14	101 ± 4 ^{n.s.}	+11
Roggensilage + A3/L	2	405 ± 5 ^{n.s.}	+13	59,1	239 ± 2 ^{n.s.}	+8	95 ± 1 ^{n.s.}	+5
Roggensilage + B4/L	2	400 ± 17 ^{n.s.}	+11	62,8	251 ± 9 [*]	+13	100 ± 3 ^{n.s.}	+10
Roggensilage + A3/B4/L	2	415 ± 7 ^{n.s.}	+15	69,3	288 ± 5 ^{***}	+30	116 ± 2 ^{***}	+28
Maissilage 4 mm	3	536 ± 42	0	62,1	333 ± 25	0	125 ± 9	0
Maissilage + A3/B4	2	532 ± 15 ^{n.s.}	-1	60,5	322 ± 14 ^{n.s.}	-3	116 ± 5 ^{n.s.}	-7
Maissilage + A3/L	2	549 ± 0 ^{n.s.}	+2	61,5	338 ± 3 ^{n.s.}	+2	124 ± 1 ^{n.s.}	0
Maissilage + B4/L	3	483 ± 21 ^{n.s.}	-10	59,3	286 ± 8 ^{n.s.}	-14	106 ± 3 [*]	-15
Maissilage 8 mm	3	543 ± 43	0	62,2	338 ± 26	0	117 ± 9	0
Maissilage + A3	2	485 ± 28 ^{n.s.}	-11	64,2	312 ± 16 ^{n.s.}	-8	104 ± 5 ^{n.s.}	-11
Maissilage + B4	3	489 ± 14 ^{n.s.}	-10	63,2	309 ± 6 ^{n.s.}	-9	102 ± 2 ^{n.s.}	-13
Maissilage + L	2	548 ± 22 ^{n.s.}	+1	61,1	335 ± 13 ^{n.s.}	-1	112 ± 4 ^{n.s.}	-5
Maissilage + A3/B4	3	496 ± 17 ^{n.s.}	-9	61,5	305 ± 10 ^{n.s.}	-10	100 ± 3 ^{n.s.}	-15
Maissilage + A3/L	3	581 ± 43 ^{n.s.}	+7	59,4	345 ± 22 ^{n.s.}	+2	113 ± 7 ^{n.s.}	-3
Maissilage + B4/L	3	502 ± 18 ^{n.s.}	-8	64,5	324 ± 13 ^{n.s.}	-4	110 ± 5 ^{n.s.}	-6
Maissilage + A3/B4/L	3	519 ± 31 ^{n.s.}	-4	64,0	332 ± 21 ^{n.s.}	-2	109 ± 7 ^{n.s.}	-7
Erntejahr 2007								
Roggensilage 8 mm	2	449 ± 19	0	54,7	245 ± 12	0	84 ± 4	0
Roggensilage + B4/L-1	2	412 ± 1 ^{n.s.}	-8	55,7	229 ± 3 ^{n.s.}	-7	78 ± 1 ^{n.s.}	-7
Roggensilage + A3/B4-1	2	418 ± 22 ^{n.s.}	-7	56,4	236 ± 12 ^{n.s.}	-4	79 ± 4 ^{n.s.}	-7
Roggensilage + A3/B4/L-1	3	428 ± 15 ^{n.s.}	-5	55,1	236 ± 14 ^{n.s.}	-4	79 ± 5 ^{n.s.}	-6
Roggensilage + B4/L-2	3	440 ± 27 ^{n.s.}	-2	56,2	247 ± 17 ^{n.s.}	+1	82 ± 6 ^{n.s.}	-2

	n	Biogas		Methan				
		Ertrag	DI	Anteil	Ertrag	DI	Ertrag	DI
		[m³/t oTS]	[%]	[Vol.-%]	[m³/t oTS]	[%]	[m³/t FM]	[%]
Roggensilage + A3/B4-2	3	481 ± 14 ^{n.s.}	+7	57,9	278 ± 8 ^{n.s.}	+13	91 ± 3 ^{n.s.}	+8
Roggensilage + A3/B4/L-2	3	462 ± 8 ^{n.s.}	+3	57,8	267 ± 6 ^{n.s.}	+9	88 ± 2 ^{n.s.}	+5

B3 = Cellulase, A3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase, Enzym-1 = 0,07 g Enzym/kg Roggen, Enzym-2 = 0,14 g Enzym/kg Roggen, n.s. = nicht signifikant, *p<0,05 (Dunnett-Test), ***p<0,001 (Dunnett-Test), n = Probenanzahl (Eudiometerrohre)

Vergleicht man die Biogas- und Methanausbeuten bezogen auf die organische Trockensubstanz der nicht silierten Rohstoffe (Abschnitt 4.9.2.1) mit denen der silierten Substanzen, so ist keine allgemeingültige Aussage möglich. Beim Mais von 2005 wurde mit den 4 sowie den 8 mm langen Häckseln eine nicht signifikant höhere Biogasausbeute bei den Rohstoffen, verglichen mit den Silagen, gemessen. Die Biogas- und Methanerträge der silierten Maissilagen von 2006 lagen über denen der nicht silierten Varianten, sind jedoch nicht signifikant differierend. Konträr dazu, lagen die Werte des silierten Roggens von 2006 unter denen des nicht silierten. Die Biogas- bzw. Methanausbeuten des nicht silierten und silierten Roggens von 2006 mit einer Häcksellänge von 4 mm zeigten signifikante Unterschiede (Biogas p<0,01, Methan p<0,05). Bei der darauffolgenden Roggensilage im Jahr 2007 wurden vergleichbare Werte für die silierten und nicht silierten Varianten gemessen. Die Gegensätze in den Ergebnissen sind unter anderem auf schwankende Substratqualitäten bzw. -zusammensetzungen und unterschiedlich aktive Biozönosen der Faulschlämme während der Methanisierung zurückzuführen. Weitere Ausführungen zur Wirkung der Silierung auf die Methanausbeute können dem Abschnitt 4.9.2.9 entnommen werden.

Generell wurden geringere Methanausbeuten mit den unbehandelten Roggensilagen im Vergleich mit denen der Maissilage ermittelt. Die Ausbeuten lagen, bezogen auf eine Tonne frisch gehäckselter Substanz, d. h. unter Einbezug der Massenverluste, bei den Mais- bzw. Roggensilagen in einem Bereich von 88 bis 125 m³/t FM bzw. 84 bis 91 m³/t FM.

In der Tab. 4-18 werden die eigenen Ergebnisse publizierten Untersuchungen zur Biogaspotenzialbestimmung von unbehandelten Mais- und Roggensilagen gegenübergestellt.

Die hier mitgeteilten Biogas- und Methanerträge, bezogen auf die organische Trockensubstanz, sind vergleichbar mit denen von Amon *et al.* [2007a; 2006b] erzielten Ergebnissen. Amon *et al.* [2007a; 2006b] verwendeten ebenso Eudiometer zur Biogaspotenzialbestimmung.

Tab. 4-18: Spezifische Biogas- und Methanerträge (Mittelwerte) der unbehandelten Mais- und Roggensilagen im Vergleich mit Literaturwerten von Batch-Gärtests

Energiepflanze	Biogasertrag [m ³ /t oTS]	Methanertrag [m ³ /t oTS]	Quelle
Maissilage	382-543	262-338	Eigene Untersuchungen
		268-366	Amon <i>et al.</i> 2007a
		359-422	Amon <i>et al.</i> 2006a
	330-960	-	Amon <i>et al.</i> 2004
	517-840	245-431	Gronauer, Kaiser 2007
		447-546	Heiermann <i>et al.</i> 2002
	630-730	350-410	Mähnert 2007
		360-363	Mukengele, Oechsner 2007
		350-380	Oechsner 2006
		490-550	Plöchl <i>et al.</i> 2001
Roggensilage	354-449	213-245	Eigene Untersuchungen
		140-275	Amon <i>et al.</i> 2006b
		397-458	Heiermann <i>et al.</i> 2002
	690-720	400-430	Mähnert 2007

Die Häcksellänge hatte auf die Methanausbeuten (m³/t FM) der silierten, unbehandelten Silagen keinen signifikanten Einfluss.

Im Folgenden werden die Wirkungen der Enzympräparate auf die Biogas- und Methanausbeuten der eingesetzten Substrate diskutiert.

Maissilage 2005

Wurden den Versuchsvarianten mit einer Häcksellänge von 4 mm Enzympräparate einzeln oder in Mischung zugesetzt, nahm die Biogasausbeute ab. Durch den Zusatz einer Mischung aus den Enzympräparaten Cellulase und Pektinase sank die Biogasausbeute signifikant um 25 % ($p < 0,05$), wahrscheinlich infolge einer Produkthemmung. Aufgrund der mechanischen Zerkleinerung auf 4 mm und einer damit verbundenen Vergrößerung der Oberfläche der Maishäcksel sowie durch die zugesetzten Enzympräparate konnte eine vermehrte Freisetzung und Akkumulation von Inhibitoren in Form von leicht vergärbaren Substraten während der Vergärungsstufen, Silierung und Biogasbildung, eintreten. Das heißt, dass die während der Fermentation gebildeten niedermolekularen Produkte die im Biogasprozess am Abbau der organischen Substanz beteiligten nativen bzw. zugesetzten Biokatalysatoren der hydrolytischen Mikroorganismen partiell inaktiviert haben können. Beispielsweise wurde für den Cellulasekomplex von *Clostridium thermocellum* in Untersuchungen von Johnson *et al.* [1982] mit verschiedenartigen Cellulosen eine Inhibierung durch die Produkte der Cellulolyse - Cellobiose und Glucose - nachgewiesen. Eine Messung der niedermolekularen Fraktionen wie Glucose oder Cellobiose war nicht Bestandteil eigener Untersuchungen. Auch kann eine Substratinhibierung die Ursache für

Mindererträge sein. Während der Silierung wurden in den Proben mit Pektinasezusatz oder Cellulase- und Pektinasezusatz partiell Lignine abgebaut und phenolische Verbindungen freigesetzt, welche während der sich anschließenden Methanisierung hemmend wirken können, bei der Variante mit dem geringsten Biogasertrag lag der Ligninabbau (Abschnitt 4.6.2) am höchsten. Ximenes *et al.* [2010] konnte zeigen, dass ausgewählte Ligninabbauprodukte, phenolische Komponenten wie Vanillin, trans-Zimtsäure und 4-Hydroxybenzoesäure, die Hydrolyse von Cellulose und Cellobiose inhibieren können. Die Wirkung liegt in der Inaktivierung der an den Reaktionen beteiligten Cellulasen und β -Glucosidasen begründet. Aufgrund von Substrat- oder Produkthemmungen war die Hydrolyse und/oder Acidogenese des Biogasprozesses gehemmt, wodurch die Biogasausbeute sank.

Die Methanbildung wurde nicht gehemmt. Der Methangehalt der mit Enzym versetzten Silagen lag über dem der unbehandelten Maissilage. Das kann vermutlich darauf zurückgeführt werden, dass die während der Silierung enzymatisch behandelten Rohstoffe nach der Silierung gegenüber der Kontrolle eine höhere Quantität an Intermediaten aufwiesen, welche während der Biomethanisierung zu höheren Methananteilen im Biogas führen. Die mit Pektinase oder Cellulase und Pektinase versetzten Silagen wiesen den höchsten Alkoholgehalt²⁸ auf, welcher deutlich über dem der unbehandelten Silage lag. Laut den theoretischen Berechnungen von Herrmann [2010] ergeben sich aus Alkoholen wie Ethanol und 1,2-Propandiol höhere Methananteile im Biogas als aus Säuren wie Milch- und Essigsäure. Trotz geringerer Biogasausbeuten konnte folglich bei den mit einer Cellulase oder Enzymmischung versetzten Proben durch hohe Methangehalte im Biogas ein Mehrertrag an Methan, bezogen auf die organische Trockensubstanz, nachgewiesen werden. Der Methanertrag der Silage mit einem Zusatz an Pektinase war gleich dem der Kontrollvariante. Bezieht man die Massenverluste²⁹ während der Silierung ein, ergeben sich deutlich abweichende Ergebnisse. Die Methanausbeuten wurden auf eine Tonne Frischmasse an Mais bezogen, so dass eine energetische Bilanzierung möglich wurde. Unter diesen Voraussetzungen erzielten die bei den 4 mm langen Häckseln eingesetzten Enzympräparate keine nennenswerte Effizienzsteigerung bzw. einen deutlichen Minderertrag an Methan.

Bei den auf 8 mm gehäckselten Rohstoffen konnte das Energiepotenzial durch Enzymzusätze während der Silierung gesteigert werden. Es war aufgrund einer geringeren Oberfläche der Häcksel ein verlangsamter Abbau der Lignocellulose und folglich ein Potenzial die Hydrolyse durch Enzymadditive zu beschleunigen gegeben. Mehrerträge waren sowohl bei der Biogas- als auch der Methanausbeute messbar. Es zeigte sich, im Vergleich mit den 4 mm Varianten, ein

²⁸Analyseergebnisse siehe Anhang 8.2

²⁹Ergebnisse siehe Anhang 8.3

konträres Bild. Der Biogasertrag wurde durch den Zusatz der Pektinase B4 um 27 % gesteigert. Der Methanertrag nahm signifikant um 34 % ($p < 0,05$) zu. Durch die zusätzliche Einmischung einer Cellulase stieg der Methanertrag um weitere 2 % auf signifikante 36 % ($p < 0,05$). Die sehr fördernde Wirkung des Pektinasepräparates, welches hemicellulolytische Nebenaktivitäten enthält, lag vermutlich in der Abspaltung von Pektinen und Hemicellulosen, welche „Kittsubstanzen“ der Bestandteile der Lignocellulosen darstellen. Ein Abbau von Hemicellulose konnte bei den mit Enzymen versetzten Proben nachgewiesen werden (Abschnitt 4.6.2). Pektingehalte wurden nicht gemessen. Die Modifizierung der Lignocellulose führte zu einer verbesserten Zugänglichkeit der einzelnen Bestandteile der Substrate während der Methanisierung. Der höchste Methanertrag wurde bei der Probe mit dem Zusatz einer Enzymmischung gemessen, welche die höchste Säurekonzentration³⁰, höchste Kohlenhydratakkumulation und den höchsten Abbau an Trockensubstanz, organischer Trockensubstanz sowie Cellulose und Hemicellulose (Abschnitt 4.6.2) nach der Silierung aufwies. Wurden die Massenverluste während der Silierung einbezogen, zeigte sich, dass die Methanerträge der enzymatisch behandelten Substrate stark abnahmen und der Zusatz einer Pektinase die beste Wirkung zeigte, die Methanausbeute konnte um 18 % gesteigert werden. Demzufolge war die mit einer Pektinase dotierte Silage und einer Häcksellänge von 8 mm die Variante mit der höchsten Energieausbeute.

Bei den mit Enzym versetzten Maissilagen wurden deutliche Zunahmen der mittleren Methangehalte nachgewiesen. Die höchsten Methangehalte waren unter Applikation von Enzymgemischen zu messen.

Maissilage 2006

Bei den unbehandelten Maissilagen von 2006 wurden höhere Biogas- und Methanausbeuten im Vergleich mit den Maissilagen von 2005 gemessen. Die nicht behandelten Proben des Jahres 2006 lagen bezüglich der 4 bzw. 8 mm langen Häcksel in den Biogasausbeuten um 12 bzw. 42 % höher. In Bezug auf die Methanausbeute waren es 25 bzw. 29 %. Bezieht man die Massenverluste³¹ während der Silierung mit ein, war eine Zunahme von 42 % ($p < 0,05$) bzw. 23 % messbar. Die Ursache hierfür könnte der verstärkte Abbau von Cellulose während der Silierung bei den Maissilagen von 2006 (Abschnitt 4.6.2), verglichen mit den Abbaugraden der Maissilagen von 2005, sein.

Der Zusatz von Mischungen aus A3/B4 oder A3/L hatte keinen Einfluss auf die Biogasausbeute der Silage mit einer Häcksellänge von 4 mm. Eine Minderung des Biogasertrages erfolgte durch

³⁰Analyseergebnisse siehe Anhang 8.2

³¹Ergebnisse siehe Anhang 8.3

den Zusatz der Mischung B4/L. Die Methanausbeuten, bezogen auf die Trockensubstanz, nahmen durch den Zusatz von A3/B4 oder B4/L ab. Wurde eine Cellulase und Laccase zugesetzt, war die Methanausbeute mit jener der unbehandelten Maissilage vergleichbar. Werden die Massenverluste³¹ auf die Methanausbeuten angerechnet, so ergeben sich keine positiven Effekte für den Einsatz von Enzympräparaten bei der Maissilage von 2006 mit einer Häcksellänge von 4 mm. Wurde eine Pektinase und Laccase appliziert, war eine signifikante Minderung der Methanausbeute von 15 % ($p < 0,05$) messbar. Da auch die Methangehalte durch den Zusatz von Enzymen, im Gegensatz zu den enzymatisch behandelten Maissilagen von 2005, abnahmen, werden im Fall der mit Cellulase und Pektinase versetzten Probe die Mindererträge auf eine Akkumulation von Hydrolyseprodukten zurückgeführt. Diese können die Methanogenese hemmen. Durch die Silierung stieg der Gehalt an flüchtigen Fettsäuren und Alkoholen³². Zusätzlich führte die enzymverstärkte Hydrolyse während der Biogasbildung zum erhöhten Abbau der Hauptbestandteile der Lignocellulose (Abschnitt 4.9.2.5) und folglich zur Freisetzung von Kohlenhydraten bzw. flüchtigen Fettsäuren. Die Kohlenhydrate können im Biogasprozess zu Monocarbonsäuren verstoffwechselt werden. Liegen die Fettsäuren in einem Übermaß vor, kann die Stoffwechseltätigkeit der Methanbildner beeinträchtigt werden [Weiland, 2003]. Durch den partiellen Abbau der Lignocellulose während der Silierung stieg auch der Gehalt an Ligninabbauprodukten (Abschnitt 4.6.2), welche ebenso auf die Methanbildung hemmend wirken können. Untersuchungen von Kayembe *et al.* [2013] bestätigen eine inhibierende Wirkung unterschiedlicher Phenolmonomere auf die Methanogenese.

Die Maissilage mit einer Häcksellänge von 8 mm war unter Anwendung von Enzympräparaten nicht effizienter als die Variante mit einer Häcksellänge von 4 mm ohne Hilfsmittelzusatz zu vergären. Allein der Zusatz von Cellulase und Laccase führte zu einer Steigerung der Biogasausbeute von 7 % bei der Vergärung der Maissilage von 2006 mit 8 mm langen Häckseln. Die ermittelte Methanausbeute der genannten Probe war mit der Methanausbeute der Kontrollvariante vergleichbar. Die Biogas- und Methanausbeute nahm durch den Zusatz von A3 oder B4 deutlich ab. Durch die Kombination der genannten Präparate war eine weitere Minderung messbar. Auch der Zusatz von L, B4/L und A3/B4/L zeigte keinen Effekt oder führte zu einer Minderung der Biogas- und Methanausbeute. Die Methanausbeuten der enzymatisch behandelten Silagen nahmen durch die Berücksichtigung der Massenverluste³³ ab.

³²Analyseergebnisse siehe Anhang 8.2

³³Ergebnisse siehe Anhang 8.3

Die Kontrollgruppe wies bei den 4 und 8 mm langen Häckseln den höchsten Methanertrag, bezogen auf eine Tonne an Mais, auf. Der höchste Ertrag wurde mit der nicht enzymatisch behandelten und auf 4 mm gehäckselten Variante erzielt.

Die Methangehalte wurden durch die unterschiedlichen Enzympräparate und -mischungen verschiedenartig beeinflusst. Die Gehalte an Methan lagen bei den mit Enzymen versetzten Silagen mit einer Häcksellänge von 4 mm geringfügig unter dem Methangehalt der Kontrollvariante. Bei den 8 mm langen Häckseln war eine Steigerung des Methangehaltes mit dem Zusatz einer Cellulase sowie den Enzymmischungen B4/L oder A3/B4/L möglich. Wurde B4, L, A3/B4 oder A3/L zugesetzt, lag der Methangehalt in gleicher Höhe oder geringfügig unter dem der unbehandelten Roggensilage.

Roggensilage 2006

Durch Enzymadditive konnten die Biogas- und Methanausbeuten bei der Anwendung von 4 mm langen Roggenhäckseln gesteigert werden. Eine signifikante Zunahme des Biogasertrages von 8 % ($p < 0,05$) bzw. 6 % ($p < 0,05$) war bei den mit Cellulase und Pektinase bzw. Cellulase und Laccase versetzten Proben zu messen. Wurden die relativ hohen Massenverluste³⁴ während der Silierung in die Berechnungen einbezogen, führte das zu einer Minderung der Methanausbeute, wodurch sich die Methanausbeuten der mit Enzym versetzten Proben dem Methanertrag der Kontrollvariante angleichen.

In Bezug auf die Varianten mit einer Häcksellänge von 8 mm konnte, ausgenommen der mit Cellulase versetzten Probe, eine Steigerung der Biogasausbeute gemessen werden. Die höchste Biogasausbeute wurde durch den Einsatz einer Mischung aus Cellulase, Pektinase und Laccase, mit einer Ertragssteigerung von 15 %, erzielt. Eine Zugabe von Einzelpräparaten förderte nicht die Methanbildung. Die Dotierung von Enzymmixturen bewirkte eine Steigerung der auf die organische Trockensubstanz bezogenen Methanausbeute. Wurden Mischungen aus Cellulase und Pektinase, Pektinase und Laccase sowie Cellulase, Pektinase und Laccase zugesetzt, nahm die Ausbeute um 14 % ($p < 0,05$), 13 % ($p < 0,05$) bzw. 30 % ($p < 0,001$) signifikant zu. Unter Einbezug der Massenverluste³⁴ sank der Mehrertrag der zuletzt genannten Roggensilage auf signifikante 28 % ($p < 0,001$). Der Einbezug der Massenverluste bei den Proben mit einem Zusatz an Cellulase und Pektinase oder Pektinase und Laccase führte dazu, dass sich die Methanausbeuten nicht mehr signifikant von der Kontrollvariante unterschieden. Der Einsatz von Enzymmischung führte zu Modifizierungen der Lignocellulose und zum Abbau nicht-strukturbildender Kohlenhydrate (Abschnitt 4.6.2) und folglich zur Methanertragssteigerung. Die höchste Methanaus-

³⁴Ergebnisse siehe Anhang 8.3

beute, bezogen auf die untersuchten Varianten, wurde bei der Silage mit der zugesetzten Mischung aus cellulolytischen, pektinolytischen und oxidativen Enzymen (A3/B4/L) und einer Häcksellänge von 8 mm erzielt.

Eine Veränderung hinsichtlich der Methangehalte konnte beim Einsatz von Enzymmischungen bei den 4 mm langen Häckseln nicht gemessen werden. Der Gehalt an Methan im Biogas stieg bei den Roggenhäckseln mit einer Länge von 8 mm durch die Dotierung von Pektinase und Cellulase enthaltenen Enzymmischungen deutlich an, am stärksten beim Einsatz von A3/B4/L. Unter Einsatz der Einzelpräparate nahm der Methangehalt ab.

Roggensilage 2007

Die Biogas- bzw. Methanausbeute der unbehandelten Roggensilage von 2007 lag, bezogen auf die organische Trockensubstanz, um 25 % bzw. 10 % höher als die der Roggensilage von 2006. Der Grund dafür liegt im strukturellen Aufbau der Roggensilagen. Im Vergleich zur unbehandelten Silage von 2006 wurde bei der Roggensilage von 2007 während der Silierung sowie Biogasproduktion sowohl für die organische Substanz als auch für das Polymer Cellulose ein wesentlich höherer Abbaugrad ermittelt (Abschnitt 4.6.2 und 4.9.2.5). Unter Berücksichtigung des Massenverlustes³⁵ war eine um 8 % geringere Methanausbeute, bezogen auf die Frischmasse, bei der Roggensilage von 2007 im Vergleich zur Silage des Vorjahres messbar.

Die bei der Silierung des Roggens von 2007 wiederholten Enzymbehandlungen mit den Mischungen B4/L, A3/B4 und A3/B4/L führten zu höheren Biogasausbeuten, verglichen mit den enzymatisch behandelten Roggensilagen von 2006. Gegenätzlich dazu wurden bei den vorbehandelten Roggensilagen von 2007 geringere Methanausbeuten erzielt. Das lässt sich durch die geringeren Methangehalte der behandelten Roggensilagen von 2007 erklären. Zudem waren bei den Silagen von 2007 höhere Massenverluste³⁵ während der Silierung messbar. Daher wurde eine deutliche Differenz zwischen den Methanausbeuten, bezogen auf die Frischmasse, der enzymatisch behandelten Roggensilagen von 2006 und 2007 gemessen. Einen signifikanten Unterschied zeigten die Silagen mit einer applizierten Mischung aus Pektinase und Laccase ($p < 0,05$) oder Cellulase, Pektinase und Laccase ($p < 0,01$). Im Gegensatz zur Silage von 2006 lag die Biogas- sowie Methanausbeute der nicht behandelten Silage von 2007 über den Ausbeuten der mit Enzympräparaten (0,07 g/kg) versetzten Varianten. Folglich wurden bei den Silagen von 2007 keine Ertragssteigerungen erzielt.

³⁵Ergebnisse siehe Anhang 8.3

Wurden die Enzymkonzentrationen erhöht, so konnte unter Einsatz einer Mischung aus Pektinase und Laccase kein Mehrertrag nachgewiesen werden. Unter Zugabe von Cellulase und Pektinase oder Cellulase, Pektinase und Laccase wurde die Biogas- und Methanausbeute gesteigert. Die höchste Methanausbeute, bezogen auf die organische Trockensubstanz bzw. die Frischmasse, war bei der Roggensilage mit einem Zusatz von Cellulase und Pektinase messbar. Die Ausbeute stieg um 13 bzw. 8 %. Die Zunahme der Enzymkonzentration führte allgemein zur verstärkten Umsetzung der organischen Substanz während der Silierung und der Methanisierung und im Speziellen zu einem erhöhten Stoffumsatz bezüglich der Cellulose während der Biogasbildung (Abschnitt 4.6.2 und 4.9.2.5). Goel & Ramachandran [1983b] konnten beim Einsatz von alkalisch vorbehandelter Bagasse oder vorbehandeltem Reisstroh mit zunehmender Enzymkonzentration steigende Hydrolyseraten messen. Ab einer bestimmten Enzymkonzentration trat eine Sättigung der Celluloseoberfläche mit Enzym ein, wodurch die Hydrolyserate nicht proportional durch die Konzentrationssteigerung des Enzyms anstieg. Dementsprechend wurde beim Einsatz der zweifachen Menge an Enzympräparat von 0,14 g/kg bei der Roggensilage von 2007 eine geringe Zunahme an Methan, aber keine Verdopplung der Methanausbeute, gemessen.

Der Methangehalt stieg bei der Roggensilage von 2007 durch den Zusatz der verwendeten Enzymmischungen und nahm mit steigender Enzymkonzentration zu. Es konnte vor allem durch die Zugabe einer Mischung aus Cellulase und Pektinase die Effizienz der Methanbildung und demzufolge die Biogasqualität gesteigert werden.

Fazit

Es wurde gezeigt, dass eine enzymatische Behandlung der Häcksel mit einer Länge von 4 mm keine Verbesserung der Biogasbildung bewirkte.

Hinsichtlich der Methanausbeuten der Silagen mit einer Häcksellänge von 8 mm war ein deutlicher Mehrertrag beim Zusatz einer Pektinase, einer Mischung aus Pektinase und Cellulase oder Pektinase, Cellulase und Laccase zu messen. Signifikante Zunahmen der Methanausbeuten, bezogen auf die Trockensubstanz, wurden durch eine Vorbehandlung der Maissilage von 2005 mit Pektinase ($p < 0,05$) oder Pektinase und Cellulase ($p < 0,05$) sowie durch eine Vorbehandlung der Roggensilage von 2006 mit Cellulase und Pektinase ($p < 0,05$) oder Pektinase und Laccase ($p < 0,05$) erzielt. Unter Einbezug der Massenverluste während der Silierung sank die Differenz der Methanausbeuten auf ein nicht signifikantes Niveau. Dieser Effekt wird von Herrmann *et al.* [2011] bestätigt. Die Methanausbeuten der Roggensilage mit einer dotierten Mischung aus Pektinase, Cellulase und Laccase und der unbehandelten Roggensilage zeigten mit und ohne Einbezug der Massenverluste eine signifikante Differenz ($p < 0,001$).

Der Methangehalt kann in Abhängigkeit vom eingesetzten Enzympräparat oder von der verwendeten Enzymmischung positiv, negativ oder nicht beeinflusst werden. Eine positive oder negative Beeinflussung des Methangehaltes in Abhängigkeit von dem eingesetzten Enzym oder der verwendeten Enzymmischung konnten auch Warthmann *et al.* [2012] in thermophilen Gärtests mit Grüngutsilage nachweisen.

Der Methangehalt der mit Enzym behandelten Mais- bzw. Roggensilagen von 2005 bzw. 2007 lag über dem der unbehandelten Silagen. Bei der Mais- bzw. Roggensilage von 2006 konnten durch Enzymmischungen, ausgenommen der Mischung aus Cellulase und Laccase, die Gehalte an Methan im Biogas bei den Varianten mit einer Häcksellänge von 8 mm gesteigert werden. Generell waren die höchsten Zunahmen an Methan im Biogas bei Substanzen mit einer Häcksellänge von 8 mm und den höchsten Essigsäurekonzentrationen in der Silage nachweisbar. Dass mit steigendem Essigsäuregehalt im Gärmuster die Methanausbeute zunimmt, weil Essigsäure ein direktes Edukt der Methansynthese ist, konnte bereits Zacharias [2008] bei Untersuchungen verschiedener Gras- und Maissilagen feststellen. Desweiteren kann der Zusammenhang zwischen Essigsäure- und Methanbildung darauf zurückgeführt werden, dass die Essigsäurebildung während der Silierung mit der Bildung von Gärprodukten mit hohen theoretischen Methanausbeuten wie Ethanol oder 1,2-Propandiol verbunden ist [Herrmann 2010].

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass in den Enzympräparaten z. B. enthaltene Lipasen, Proteasen oder Amylasen einen Abbau von Zellinhaltsstoffen bewirkten und folglich die Methanausbeute beeinflussten.

4.9.2.3 Spezifische Biogas- und Methanerträge der direkt vor dem Biogasprozess enzymatisch behandelten Silage

Neben einer Enzymmischung aus Cellulase und Pektinase wurde der Zusatz von Wasser zur unbehandelten oder enzymatisch behandelten Silage direkt vor dem Biogasprozess als Vorbehandlungsmethode untersucht. Der Zusatz von Wasser kann zu einer besseren Zugänglichkeit der Lignocellulose für die zugesetzten oder getreideeigenen Enzyme oder epiphytischen Mikroorganismen führen. El Seoud *et al.* [2008] versetzte verschiedene cellulosehaltige Materialien wie mikrokristalline Cellulose, Baumwolle und Eukalyptus mit Wasser und beobachtete ein sehr starkes Quellen. Es wurde eine Quellung für mikrokristalline Cellulose von 54 Gew.-% ermittelt. Die Hydratisierung der Cellulose ist in Abb. 4-33 wiedergegeben. Von Gruber [2005a] wurde angegeben, dass in einem ersten Schritt die zugänglichen amorphen Bereiche der Cellulose aufquellen. In einem zweiten Schritt lagern sich die Lösungsmittelmoleküle in das Gitter der Cellulose ein, wonach der letzte Schritt eine laminare Defibrillierung umfasst.

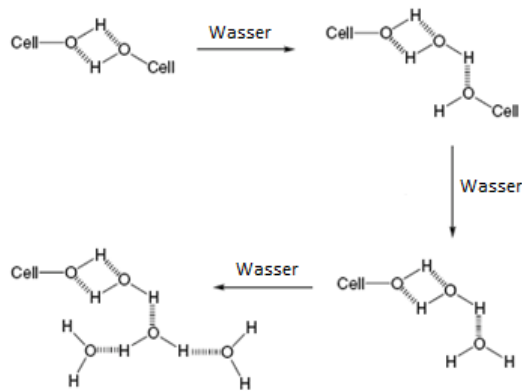


Abb. 4-33: Hydratisierung von Cellulose (Cell = Cellulose) [nach El Seoud *et al.* 2008]

Bock & Ohm [1983] wiesen für den Cellulosegehalt von Lignocellulose-Präparaten aus Obst und Gemüse eine Korrelation mit der Wasserbindungskapazität (WBC, maximal pro g Substanz aufgenommene Gewichtsmenge an dest. Wasser) nach. Verschiedenartige Pektinpräparate weisen im Vergleich zur mikrokristallinen Cellulose eine höhere WBC auf. Bariska [2001] gab an, dass Hemicellulosen aufgrund ihrer amorphen Struktur leicht Wasser aufnehmen und verlangsamt wieder abgeben.

offensichtlich strukturiert sich das Wasser selbst in der amorphen Umgebung. Dadurch können hydrolytische Enzyme Hemicellulosen abbauen und schwer zugängliche Bereiche freilegen. Es ist weiterhin bekannt, dass Lignocellulose eine hohe WBC, ein hohes Quellvermögen sowie eine hohe Quellgeschwindigkeit aufweist. Ein vollständiges Aufquellen von Lignocellulose in einer Minute und eine WBC von 7 l/kg sind in der Literatur angegebene Werte. [El Seoud *et al.*, 2008; Warzecha, 2006]

Für die Wirksamkeit von Enzymen ist der Wassergehalt im Medium von herausragender Bedeutung. Der Wassergehalt im Reaktionsgemisch beeinflusst in starkem Maße die Hydrolysegeschwindigkeit. Zudem besitzen Enzyme in wässrigen Umgebungen eine entropiegestützte Konformationsmobilität, welche für eine optimale Katalyse notwendig ist. Vor allem im Korn der Energiepflanzen lokalisierte Enzyme wie α - und β -Amylasen, Proteinasen, Lipasen, Phytasen, Lipoxygenasen, Peroxidasen, Katalasen, Polyphenoloxidasen und Arabinoxylan-Hydrolasen können durch eine erhöhte Wassermenge im Reaktionsmedium aktiviert werden. [Gayk, 2006; Belitz *et al.*, 2001]

Bezüglich der Vorhydrolyse zum Aufschluss von Biogassubstraten mittels Enzympräparaten oder Wasserzusätzen sind wenige Berichte bekannt geworden. In einem ersten Versuch von Angelidaki & Ahring von 2000 mit aus Rindergülle stammenden Faserstoffen konnte durch ein Hemicellulose abbauendes Bakterium (B4) das Methanbildungspotenzial signifikant um 30 % gesteigert werden. Im Gegensatz zur eigenen Arbeit wurde mit einer langen Verweilzeit der Vorhydrolyse von 7 d und einer hohen Temperatur von 70 °C sowie einer anschließenden thermophilen Vergärung gearbeitet. Im Jahr darauf wurde von Sonakya *et al.* [2001] dargestellt, dass die Vorhydrolyse von verdorbenen bzw. beschädigten Weizenkörnern für 24 h bei 37 °C mit

dem Enzyme „Trizyme“³⁶ zu einer Steigerung der Methanproduktion von 7 bis 14 % während der mesophilen Vergärung führen kann. Faulstich & Schieder [2008] konnten keine signifikanten Differenzen in den Gasausbeuten nach einer Vorhydrolyse und mesophilen Vergärung von enzymatisch unbehandelter oder mit Cellulase und Amylase oder Pektinase versetzter Maissilage messen. Die Untersuchungen zur Vorhydrolyse wurden bei 50 °C für 24 h bei einem Wasserzusatz von 1:1,2 (Substrat:Wasser) und bereits mechanisch vorbehandelter Silage durchgeführt. Gleiches gilt für die Untersuchungen von Stenströmer Moglia [2008], in denen mechanisch vorbehandelter Weizen oder mechanisch vorbehandeltes Weizenstroh (0,5-1 mm) mit einer Mischung aus Hemicellulase und Cellulase (*Hypocrea jecorina*) für 3 Tage unter meso- oder thermophilen Bedingungen bei pH 5 hydrolysiert und bei mesophilen Bedingungen fermentiert wurde. Signifikante Differenzen waren nur in den ersten Tagen der Methanisierung messbar. Von Suarez Quinones *et al.* [2009] wurde der Zusatz einer kommerziellen Enzymmischung bei der Vorbehandlung verschiedenartiger Substrate geprüft. Als optimal erwies sich eine enzymatische Vorbehandlung bei 40 °C und pH 5,4. Bei der anschließenden mesophilen, 30-tägigen Vergärung im Labormaßstab konnten signifikante Methanertragssteigerungen ($p < 0,05$) beim Einsatz von Roggenschrotsilage, Maissilage, Futterresten und Festmist nachgewiesen werden. Bei den Untersuchungen von Romano *et al.* [2009] zur siebentägigen, enzymatischen Vorbehandlung von Weizengras unter Einsatz einer Enzymmischung aus Cellulase und Hemicellulase (Novozym 342³⁷) konnte eine nicht signifikante Ertragssteigerung ($p < 0,05$) an Methan von 7 % bei der anschließenden thermophilen Vergärung ermittelt werden. Bruni, Jensen & Angelidaki [2010] befassten sich in einer weiteren Arbeit mit Untersuchungen zur Methanertragssteigerung durch die Vorbehandlung von Faserstoffen aus Rindergülle bei der thermophilen Biogasproduktion. Es wurde festgestellt, dass z. B. unter Einsatz von Laccase (DeniLite II S³⁸) und einer Mischung aus Cellulase und Hemicellulase (Novozym 342³⁹) bei einer Vorhydrolyse von 20 h bei 37 °C kein Effekt auf die Methanausbeute messbar war, ebenso beim Einsatz weiterer Laccasen (Novozyme 51003⁴⁰, Laccase EN-204⁴¹). Ein Effekt durch die Laccase Novozyme 51003 trat nur bei der Kombination einer Dampf- und Enzymbehandlung auf. Bei der enzymatischen 24-stündigen Vorhydrolyse von mechanisch behandelten Zuckerrübenschnitzeln (2,5 mm Partikel) bei 50 °C mit Celustar XL⁴² und Agropect pomace⁴³ (3:1, v/v) konnten

³⁶Trizyme - Cellulase, α -Amylase, Protease

³⁷Novozym 342 - Cellulase, Hemicellulase (*Humicola insolens*)

³⁸DeniLite II S - Laccase (*Aspergillus oryzae*)

³⁹Novozym 342 - Cellulase, Hemicellulase (*Humicola insolens*)

⁴⁰Novozyme 51003 - Laccase (*Myceliophthora thermophila*)

⁴¹Laccase EN-204 - Laccase (*Trametes versicolor*)

⁴²Celustar XL - Endoglucanase, Xylanase (*Trichoderma longibrachiatum*)

⁴³Agropect pomace - Pektinase

Zieminski *et al.* [2012] die Biogasausbeute um 19 % steigern. Eine Steigerung der Biogasproduktion erzielten auch Antonopoulou & Lyberatos [2012] bei der eintägigen Vorhydrolyse (50 °C, pH 4,8) von stark zerkleinerten Zuckerhirsestielen (1-2 mm) mit Celluclast 1.5L oder Celluclast 1.5L⁴⁴ und Novozyme 188⁴⁵. Bei der mesophilen Vergärung stieg der Methanertrag um 17 % bzw. 20 %.

Perez Lopez *et al.* [2005] zeigten, dass ein Wasserzusatz für 9 d bei Raumtemperatur und einem Mischungsverhältnis zwischen Wasser und Substrat von 1:2 die Methanausbeute von Maiskörnern steigern kann. Wiesen diese nach dem Mahlen eine Größe von 1 mm bzw. 5 mm auf, konnten Mehrerträge von 18 bzw. 17 % unter mesophilen Bedingungen gemessen werden. Nach dem Autoklavieren von Maissilage für 20 min bei 121 °C konnte keine Veränderung bezüglich der Methanausbeute nachgewiesen werden. Viehmann [2008] weist auf eine bessere Vergärung von Stroh mit Enzymzusatz durch das Einweichen des Substrates in Perkolat für 12 h bei 35 °C hin. Der Wert des CSB – Chemischer Sauerstoffbedarf als Summe aller in Wasser vorliegenden oxidierbaren Stoffe – wurde durch das Einweichen um 30 % gesteigert, was darauf hinweist, dass eine Vielzahl an Molekülen in Lösung vorliegt und folglich für den Stoffwechsel der Mikroorganismen im Biogasprozess zur Verfügung steht. Mit dem zusätzlich dosierten Enzympräparat (MethaPlus^{®46}) konnte der CSB um weitere 6 % gesteigert werden. Die Vorbehandlung mit Perkolat- und Enzymzusatz erzielte eine Methanertragssteigerung bei der mesophilen Vergärung von 13 %.

Arbeiten von Lehtomäki [2004] zeigten, dass ein Enzym- oder Wasserzusatz für 24 h bei 35 °C sowie das Autoklavieren für 30 min bei 121 °C und 1 bar vor der Methanisierung von Gras die Methanausbeute um 13 bis 17 % erhöhen kann.

Aufgrund unterschiedlicher Versuchsbedingungen und -substrate sind die Ergebnisse der aufgeführten Berichte nur bedingt vergleichbar und lassen keinen eindeutigen Schluss zu.

Der vorliegenden Fachliteratur nach zu urteilen, wurde demnach bei den eigenen Untersuchungen erstmalig eine Vorhydrolyse von Roggensilage unter Einsatz von Cellulase und Pektinase sowie Wasser zur Verbesserung der Biogasproduktion durchgeführt.

Vergleicht man die Biogas- und Methanausbeuten des in unterschiedlichen Gärtests vergorenen, unbehandelten und silierten Roggens von 2007 (Tab. 4-17 im Abschnitt 4.9.2.2, Tab. 4-19), so können keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Die bei der Roggensilage von 2007

⁴⁴Celluclast 1.5L - Cellulase (*Trichoderma reesei*)

⁴⁵Novozyme 188 – Cellobiase (*Aspergillus niger*)

⁴⁶MethaPlus[®] - β -Glucanase, Cellulase, Xylanase (*Trichoderma reesei*)

durchgeführten Vorbehandlungen während einer 24-stündigen Vorhydrolyse belegten eine nicht signifikante Steigerung der spezifischen Biogas- und Methanausbeute (Tab. 4-19).

Tab. 4-19: Spezifische Biogas- und Methanerträge (Mittelwert \pm Standardabweichung), mittlere Methangehalte und Differenzen DI aus den Biogas- und Methanerträgen der direkt vor dem Biogasprozess unbehandelten und enzymatisch behandelten Roggensilagen des Erntejahres 2007 mit einer Häcksellänge von 8 mm

	n	Biogas		Methan			
		Ertrag	DI	Anteil	Ertrag	Ertrag	DI ¹⁾
		[m ³ /t oTS]	[%]	[Vol.-%]	[m ³ /t oTS]	[m ³ /t FM]	[%]
Roggensilage 8 mm	3	443 \pm 27	0	58,2	258 \pm 17	87 \pm 6	0
Roggensilage + P	2	439 \pm 48 ^{n.s.}	-1	59,7	262 \pm 12 ^{n.s.}	88 \pm 4 ^{n.s.}	+2
Roggensilage + E	3	470 \pm 16 ^{n.s.}	+6	59,9	282 \pm 15 ^{n.s.}	95 \pm 5 ^{n.s.}	+9
Roggensilage + P/E	3	461 \pm 28 ^{n.s.}	+4	58,5	270 \pm 22 ^{n.s.}	91 \pm 7 ^{n.s.}	+5
Roggensilage + W	2	545 \pm 51 ^{n.s.}	+23	58,8	320 \pm 33 ^{n.s.}	107 \pm 11 ^{n.s.}	+24
Roggensilage + P/W	2	584 \pm 49 ^{n.s.}	+32	55,0	322 \pm 28 ^{n.s.}	108 \pm 9 ^{n.s.}	+25
Roggensilage + W/E	2	515 \pm 51 ^{n.s.}	+16	58,5	301 \pm 32 ^{n.s.}	101 \pm 11 ^{n.s.}	+17
Roggensilage + P/W/E	3	493 \pm 50 ^{n.s.}	+11	55,8	275 \pm 31 ^{n.s.}	92 \pm 11 ^{n.s.}	+7

P = Pasteurisieren: 90 °C, 1 bar, 20 Minuten; E = Enzym: A3 + B4, 1 kg je Enzym /t TS Roggen; W = Wasser: 350 g Silage + 350 g Wasser; n.s. = nicht signifikant, n = Probenanzahl (Eudiometerrohre), ¹⁾bezogen auf [m³/t oTS]

Das Pasteurisieren bewirkte nur eine geringe Zunahme der Methanausbeute von 2 %. Wurde die Roggensilage mit einer Enzymmischung aus Cellulase und Pektinase versetzt, stieg die Biogas- bzw. Methanausbeute um 6 bzw. 9 %. Um die Wirkung des Enzymmixes zu ermitteln, d. h. Umsetzungen der Reaktionsprodukte durch in der Silage befindliche Mikroorganismen auszuschließen, wurde die Roggensilage vor der Enzymgabe pasteurisiert. Für die pasteurisierte und enzymierte Roggensilage ergab sich eine Zunahme an Biogas- bzw. Methan von 4 bzw. 5 %. Wurde die Roggensilage zusätzlich mit Wasser versetzt, stieg der Biogas- bzw. Methanertrag um weitere 7 bzw. 2 %. Die Zugabe von Wasser wirkte sich besonders positiv auf die Erträge aus. Die Biogasausbeute stieg um 23 % und die Methanausbeute um 24 %. Wurde pasteurisierte Roggensilage bei der Wässerung und anschließenden Biogasproduktion verwendet, stiegen die Biogas- und Methanausbeute um weitere 9 bzw. 1 %. Die Zunahme an Biogas und Methan durch den Einsatz von Wasser liegt vermutlich in dem Quellvermögen der Lignocellulose (LCC) und einer damit verbundenen besseren Zugänglichkeit der einzelnen Biopolymere der LCC, der Aktivierung korneigener Enzyme und der Steigerung der Enzymaktivität und -mobilität der zugesetzten Enzympräparate begründet. Detailliertere Ausführungen können dem Abschnitt 4.7 und 4.9.2.5 entnommen werden. Mit einer Dotierung von Wasser und Enzym lag die Biogasausbeute um 7 % niedriger, die Methanausbeute jedoch um 10 bzw. 8 % höher, verglichen mit den Werten der enzymatisch behandelten oder der mit Wasser vorbehandelten Roggensilage. Die Zunahmen an Biogas- bzw. Methan betrugen 16 bzw. 17 %.

Aufgrund der starken Heterogenität der mit Wasser versetzten Proben ergaben sich starke Schwankungen in den Biogas- und Methanausbeuten der drei Ansätze einer Probe und folglich wurden trotz hoher Mehrerträge keine signifikanten Ertragssteigerungen gemessen.

Die höchste Biogas- und Methanaubeute wies die pasteurisierte und mit Wasser vorbehandelte Roggensilage auf. Aufgrund der geringen Anzahl an Versuchsansätzen für jede Variante und der starken Schwankungen zwischen den einzelnen Messwerten wird eine Wiederholung des Versuches empfohlen.

Höhere Methangehalte im Biogas im Vergleich zur Kontrolle wiesen die durch ein Pasteurisieren, einen Enzym- oder Wasserzusatz behandelten Roggensilagen auf. Wurden die Verfahren kombiniert, ergab sich keine nennenswerte Änderung bzw. eine Minderung hinsichtlich des prozentualen Anteils von Methan im Biogas. Minderungen traten bei den pasteurisierten und mit Wasser oder mit Wasser sowie einer Enzymmischung versetzten Proben auf.

4.9.2.4 Spezifische Biogas- und Methanerträge der während des Biogasprozesses enzymatisch behandelten Silagen

In der während dieser experimentellen Arbeit bekannt gewordenen wissenschaftlichen Literatur zum Enzymeinsatz im Biogasreaktor kamen hauptsächlich Cellulasen und Hemicellulasen, insbesondere Xylanasen, zum Einsatz. Enzyme wie Lipase, Protease, Amylase, β -Galactosidase, Pektinase, Phytase oder Laccase waren ebenso Bestandteil von Untersuchungen. Die Ergebnisse der genannten Untersuchungen sind zusammenfassend im Anhang 8.1 aufgelistet. Aufgrund unterschiedlicher Messsysteme, Impfmaterien, Substrate, Substrat- und Enzymkonzentrationen, Versuchsbedingungen (Verweilzeit, Temperatur) sowie verschiedenartiger Verhältnisse der organischen Trockensubstanz von Substrat und Impfmateriel ist eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse nur bedingt gegeben. Auch die zugesetzten Enzyme variieren in der Art und Herkunft. Zudem wird in einigen Arbeiten nur das ermittelte Biogaspotenzial dargestellt. Eine Auskunft über den Ertrag des Methangases ist nicht gegeben. Somit ist die Enzymleistung zumeist nur unzureichend dargestellt.

Maissilage wurde bisher am häufigsten in Untersuchungen zur enzymatischen Vorbehandlung sowohl im Labor- als auch im Technikums- und Praxismaßstab untersucht. Möglich sind unter mesophilen Bedingungen im Labormaßstab Methanertragssteigerungen von 3 bis 18 %. [Weiß & Brückner, 2008; Telschow, 2006; Amon, 2005a; Kaiser, 2004] Brulé [2007] verwendete in seiner Arbeit ausgesuchte Bestandteile der Maispflanze wie Maiskolben oder Maisstroh. Die zur enzymatischen Vorbehandlung ausgewählten Enzympräparate konnten die Methanausbeute im mesophilem Batch-Gärtest nicht oder nur geringfügig erhöhen. Aufgrund einer sehr intensiven

mechanischen Vorbehandlung wie bei Brulé [2007] oder Faulstich & Schieder [2008] ist anzunehmen, dass kein Potenzial für eine Enzymwirkung gegeben ist. Auch im Technikumsmaßstab sind 2 bis 18 % Mehrertrag an Methan bei mesophiler Versuchsführung unter Einsatz von Maissilage erzielbar. [Lebuhn *et al.*, 2010; Weiß & Brückner, 2008; Telschow, 2006] Bei der Anwendung thermophil betriebender Durchflussfermenter zur Evaluierung der Wirkung von Cellulase-, Amylase- und β -Galactosidasepräparaten konnte kein Einfluss auf die Methanausbeute nachgewiesen werden. [Lebuhn *et al.*, 2010] Von Gerhardt [2007] wurden Ergebnisse aus Praxisversuchen veröffentlicht. Durch den Einsatz des Präparates, einer Mischung aus hauptsächlich Cellulase, Xylanase und β -Glucanase, in 30 unterschiedlichen Biogasanlagen war eine Steigerung der Biogasausbeute von 4 bis 35 % messbar. Die darauf bezogenen dominierenden Substrate in den meso- und thermophil betriebenen Anlagen waren Maissilage und Rindergülle mit Anteilen von 26,4 bzw. 11,5 %.

Eine enzymatische Behandlung erwies sich in wenigen Versuchen bei dem Einsatz unterschiedlich siliierter Grasarten in mesophilen Batch-Tests unter ausgewählten Versuchsbedingungen als wirkungsvoll. Eine Wirkung konnte durch den Zusatz von Cellulase (Novozyme 51008 L⁴⁷), Enzymmischungen (Cellupract AL 70⁴⁸, MethaPlus[®] S 100⁴⁹, Novozyme 342⁵⁰) und einer Lipase (Resinase A2X⁵¹) nachgewiesen werden. [Lüttich, 2008; Amon *et al.*, 2007b; Amon, 2005a] Im Gegensatz dazu war kein Effekt beim Einsatz von Cellulose und Hemicellulose spaltenden Enzymen bei den Untersuchungen von Weiß & Brückner [2008] messbar. Wurden thermophile Versuchsbedingungen gewählt, konnte unter Einsatz von Weizengras und einer Mischung aus Cellulase und Hemicellulase (Novozyme 342) keine Methanertragssteigerung gemessen werden. [Romano *et al.*, 2009]

Der Zusatz einer Protease bei der Vergärung von Mais- bzw. Grassilage hatte keine Wirkung auf die Methanbildung. [Amon, 2005a] Bei thermophilen Versuchsbedingungen in einstufigen Biogasprozessen wirkten sich Enzymzusätze tendenziell negativ auf die Methanausbeute aus. [Lebuhn *et al.*, 2010; Romano *et al.*, 2009]

Die enzymatische Vorbehandlung von Roggensilage wurde *bis dato* in einem mesophilen Batch-Versuch von Schuhmann [2007] getestet. Bei der direkten einmaligen Zugabe der Enzymmischung wurden Mindererträge ermittelt.

⁴⁷Novozyme 51008 L - Cellulase

⁴⁸Cellupract AL 70 - Cellulase, Xylanase, β -Glucanase (*Trichoderma reesei*)

⁴⁹MethaPlus[®] S 100 - β -Glucanase, Cellulase, Xylanase (*Trichoderma reesei*)

⁵⁰Novozyme 342 - Cellulase, Hemicellulase (*Humicola insolens*)

⁵¹Resinase A2X - Lipase

Untersuchungen von Wulf & Clemens [2009] mit Mais-, Roggen- bzw. Grassilage zeigten unter den gewählten Versuchsbedingungen (mesophil, Batch, quasi-kontinuierliche Fermentation) keinen nachweisbaren Enzymeffekt.

Cordes [2006] stellte Untersuchungen vor, in denen 25 Enzympräparate, kommerzielle und im Projekt hergestellte Präparate, bei Mischungen aus Gülle und Kosubstraten von verschiedenen Biogasanlagen auf deren Wirkung geprüft wurden. In mesophilen Batch-Versuchen von 5-7 d erbrachten die 12 effektivsten Enzympräparate eine Steigerung der Biogasausbeute von 13 bis 52 %. Unter den effektivsten Enzympräparaten befanden sich Präparate mit den Hauptaktivitäten Xylanase, Phytase, Pektinase, Cellulase und Protease.

Bei Jayasinghe *et al.* [2011] wurden oxidativ wirkende Enzympräparate bei Siedlungsabfällen zum Abbau von Lignin eingesetzt. Dabei wurden verschiedene Peroxidasen sowie eine Laccase in unterschiedlichen Konzentrationen den Gärsubstraten bei mesophilen Laborversuchen zugesetzt. Die eingesetzte Mangan-Peroxidase konnte in bedeutendem Maße die Methanausbeute sowie den Ligninabbau erhöhen.

Eine enzymatische Vorbehandlung von mechanisch vorbehandelter Zwerghirse in mesophilen Batchtests mit hydrolytischen Enzymen, Kernenzyme (Novozymes Biopharma Sweden AB), führte zu keinem Effekt, bezogen auf das Methanbildungspotenzial. [Nigatu *et al.*, 2012]

Der aktuellen Literatur zufolge, fehlen Methoden zur enzymatischen Aufbereitung von Roggensilage. Maissilage wurde in geringem Umfang bereits untersucht, wobei die Effekte der Enzymgabe unterschiedlich ausfielen.

Im nachfolgenden Abschnitt wird das Biogas- und Methanbildungspotenzial der unbehandelten und enzymatisch vorbehandelten Mais- und Roggensilagen dieser Arbeit angegeben und diskutiert.

Maissilage 2006

Werden die unbehandelten Maissilagen mit einer Häcksellänge von 4 bzw. 8 mm verglichen, so waren höhere Biogas- und Methanausbeuten bei den kürzeren Häckseln messbar (Tab. 4-20).

Die Biogas- und Methanausbeuten der Maissilage mit einer Häcksellänge von 4 mm konnten durch den Zusatz einer Mischung aus Cellulase und Laccase gesteigert werden. Bei den Maishäckseln mit einer Länge von 8 mm war eine signifikante Steigerung der Biogasausbeute durch den Einsatz der Mischung aus Cellulase und Pektinase in Höhe von 20 % ($p < 0,05$) nachweisbar. Weiterhin war bei den Häckseln mit einer Länge von 8 mm eine deutliche Zunahme der Methanausbeute durch die Dotierung einer Pektinase, einer Mischung aus Pektinase und Cellulase oder

Pektinase und Laccase sowie einer Mischung aller Enzympräparate von 9, 12, 11 oder 12 % möglich.

Tab. 4-20: Spezifische Biogas- und Methanerträge (Mittelwerte \pm Standardabweichungen), mittlere Methangehalte und Differenzen DI aus den Biogas- und Methanerträgen der während des Biogasprozesses vorbehandelten Maissilagen des Erntejahres 2006 mit unterschiedlicher Häcksellänge

	n	Biogas		Methan			
		Ertrag	DI	Anteil	Ertrag	Ertrag	DI ¹⁾
		[m ³ /t oTS]	[%]	[Vol.-%]	[m ³ /t oTS]	[m ³ /t FM]	[%]
Maissilage 4 mm	2	482 \pm 14	0	57,9	280 \pm 8	105 \pm 3	0
Maissilage + A1/B1	2	466 \pm 8 ^{n.s.}	-3	59,4	277 \pm 6 ^{n.s.}	104 \pm 2 ^{n.s.}	-1
Maissilage + A1/L	2	530 \pm 13 ^{n.s.}	+10	55,7	295 \pm 6 ^{n.s.}	110 \pm 2 ^{n.s.}	+5
Maissilage + B1/L	3	492 \pm 12 ^{n.s.}	+2	57,6	284 \pm 8 ^{n.s.}	106 \pm 3 ^{n.s.}	+1
Maissilage 8 mm	3	445 \pm 41	0	58,9	262 \pm 25	91 \pm 9	0
Maissilage + A1	3	461 \pm 4 ^{n.s.}	+4	58,5	269 \pm 1 ^{n.s.}	93 \pm 0 ^{n.s.}	+3
Maissilage + B1	3	484 \pm 23 ^{n.s.}	+9	58,1	286 \pm 10 ^{n.s.}	99 \pm 3 ^{n.s.}	+9
Maissilage + L	2	466 \pm 24 ^{n.s.}	+5	58,6	273 \pm 9 ^{n.s.}	95 \pm 3 ^{n.s.}	+4
Maissilage + A1/B1	3	533 \pm 19 [*]	+20	55,0	294 \pm 10 ^{n.s.}	102 \pm 3 ^{n.s.}	+12
Maissilage + A1/L	3	470 \pm 13 ^{n.s.}	+6	56,3	264 \pm 6 ^{n.s.}	92 \pm 2 ^{n.s.}	+1
Maissilage + B1/L	3	522 \pm 45 ^{n.s.}	+17	58,2	291 \pm 24 ^{n.s.}	101 \pm 8 ^{n.s.}	+11
Maissilage + A1/B1/L	2	508 \pm 17 ^{n.s.}	+14	57,8	294 \pm 10 ^{n.s.}	102 \pm 3 ^{n.s.}	+12

A1 = Cellulase, B1 = Pektinase, L = Laccase, n.s. = nicht signifikant, *p<0,05 (Dunnett-Test), n = Probenanzahl (Eudiometerrohre), ¹⁾ bezogen auf [m³/t oTS]

Es ist deutlich erkennbar, dass eine Enzymwirkung vor allem unter Anwendung einer Pektinase oder mit Pektinase versetzten Enzymmischungen gemessen werden konnte. Die Anwendung von Mischungen steigerte die Methanausbeute im Vergleich zum Einsatz des Einzelpräparates mit einer pektinolytischen Hauptaktivität bei den 8 mm Häckseln um weitere 2 bis 3 %. Die geringe zusätzliche Ausbeute rechtfertigt aufgrund hoher Enzympreise nicht den Einsatz mehrerer Enzyme. Der Einsatz einer Pektinase wäre bei dem Einsatz von 8 mm langen Häckseln zu bevorzugen (Abschnitt 8.8). Die höchste Methanausbeute wurde bei der Maissilage mit einer Häcksellänge von 4 mm und einer Dotierung von Cellulase und Laccase gemessen.

Trotz Zunahme an Methan durch den Einsatz von Enzympräparaten bei dem Substrat mit einer Häcksellänge von 8 mm wurde eine höhere Methanausbeute bei dem unbehandelten Substrat mit einer Häcksellänge von 4 mm nachgewiesen. Ist das Zerkleinern auf 4 mm dem Enzymeinsatz ökonomisch überlegen, ist ein Häckseln auf 4 mm vorzuziehen. Eine ökonomische Betrachtung ist diesbezüglich nur nach einer Übertragung in den Praxismaßstab möglich, da der Energieeintrag für die Zerkleinerung nicht in Laborversuchen praxisnah evaluiert werden kann.

Die Biogasqualität wurde durch den Zusatz von Präparatmischungen aus Cellulase und Pektinase oder Cellulase und Laccase beeinflusst. Bei den Maissilagen mit der höchsten Biogasausbeute war, unabhängig vom Häckselgrad, der geringste Methangehalt zu registrieren.

Die Zunahmen an Methan durch die Applikation von Enzympräparaten bezüglich der Maissilage liegen im Bereich der in den Literaturberichten ermittelten Methanertragssteigerungen.

Roggensilage 2006

Wie bei der Maissilage von 2006 wurden höhere Biogas- und Methanausbeuten bei den unbehandelten und auf 4 mm gehäckselten Roggenpartikeln, verglichen mit den unbehandelten 8 mm langen Partikeln, erzielt (Tab. 4-21).

Eine Steigerung der Biogas- und Methanausbeute durch den Zusatz von Enzymmischungen konnte im Zuge der eigenen Untersuchungen bei den 4 mm Häckseln nicht erzielt werden. Eine signifikante Minderung ($p < 0,05$) der Biogasausbeute war unter Anwendung einer Präparatmischung aus Cellulase und Pektinase messbar. Gründe für eine fehlende Wirkung bzw. eine Minderung des Methanertrages können dem Abschnitt 4.9.2.7 entnommen werden.

Tab. 4-21: Spezifische Biogas- und Methanerträge (Mittelwerte \pm Standardabweichungen), mittlere Methangehalt und Differenzen DI aus den Biogas- und Methanerträgen der während des Biogasprozesses vorbehandelten Roggensilagen des Erntejahres 2006 mit unterschiedlicher Häcksellänge

	n	Biogas		Methan			
		Ertrag	DI	Anteil	Ertrag	Ertrag	DI ¹⁾
		[m ³ /t oTS]	[%]	[Vol.-%]	[m ³ /t oTS]	[m ³ /t FM]	[%]
Roggensilage 4 mm	2	472 \pm 7	0	57,0	269 \pm 7	107 \pm 3	0
Roggensilage + A1/B1	2	413 \pm 14 *	-13	58,5	241 \pm 8 ^{n.s.}	96 \pm 2 ^{n.s.}	-10
Roggensilage + A1/L	2	461 \pm 4 ^{n.s.}	-2	55,7	257 \pm 2 ^{n.s.}	102 \pm 1 ^{n.s.}	-4
Roggensilage + B1/L	2	443 \pm 9 ^{n.s.}	-6	57,2	253 \pm 4 ^{n.s.}	101 \pm 2 ^{n.s.}	-6
Roggensilage 8 mm	3	429 \pm 21	0	56,0	240 \pm 13	97 \pm 5	0
Roggensilage + A1	3	426 \pm 30 ^{n.s.}	-1	56,9	242 \pm 20 ^{n.s.}	98 \pm 8 ^{n.s.}	+1
Roggensilage + B1	3	444 \pm 9 ^{n.s.}	+3	57,5	255 \pm 8 ^{n.s.}	103 \pm 3 ^{n.s.}	+6
Roggensilage + L	2	433 \pm 31 ^{n.s.}	+1	56,6	245 \pm 11 ^{n.s.}	99 \pm 4 ^{n.s.}	+2
Roggensilage + A1/B1	3	438 \pm 9 ^{n.s.}	+2	54,8	240 \pm 6 ^{n.s.}	97 \pm 3 ^{n.s.}	0
Roggensilage + A1/L	3	435 \pm 27 ^{n.s.}	+1	54,8	238 \pm 17 ^{n.s.}	97 \pm 7 ^{n.s.}	-1
Roggensilage + B1/L	3	456 \pm 7 ^{n.s.}	+6	55,8	255 \pm 2 ^{n.s.}	103 \pm 1 ^{n.s.}	+6
Roggensilage + A1/B1/L	3	458 \pm 11 ^{n.s.}	+7	57,3	262 \pm 6 ^{n.s.}	106 \pm 3 ^{n.s.}	+9

A1 = Cellulase, B1 = Pektinase, L = Laccase, n.s. = nicht signifikant, * $p < 0,05$ (Dunnett-Test), n = Probenanzahl (Eudiometerrohre), ¹⁾bezogen auf [m³/t oTS]

Hinsichtlich der 8 mm langen Häcksel wurden nennenswerte Zunahmen an Methan unter Einsatz der Pektinase bzw. der Mischung aus Pektinase und Laccase oder Cellulase, Pektinase und Laccase gemessen. Da die Pektinase als Einzelpräparat die gleiche spezifische Methanausbeute

wie unter Einmischung einer Laccase aufwies und die Mischung aus drei Enzympräparaten die Ausbeute gegenüber dem Einzelpräparat nur um weitere 3 % steigerte, verbunden mit einem enormen Kostenanstieg, ist das Pektinasepräparat einer Präparatmischung vorzuziehen.

Einerseits wurde eine Zunahme an Methan durch den Zusatz ausgewählter Enzympräparate beim Einsatz der 8 mm langen Roggenhäcksel nachgewiesen, andererseits war die höchste Biogas- und Methanausbeute unter Anwendung von Substraten mit einer Häcksellänge von 4 mm zu messen. Die höchste Biogas- und Methanausbeute zeigte die unbehandelte Roggensilage mit einer Häcksellänge von 4 mm.

Die Zugabe der Enzymmischungen aus Cellulase und Pektinase oder Cellulase und Laccase sowie Cellulase, Pektinase und Laccase zeigte einen Effekt auf die Biogasqualität.

Soweit bekannt, konnte erstmalig durch den Zusatz von Einzel- bzw. Mischpräparaten zur Roggensilage im Vergleich mit den Ergebnissen von Literaturberichten ein Mehrertrag an Methan von bis zu 9 % erzielt werden. Die positive Wirkung wird unter anderem auf den Einsatz von Enzympräparaten mit geeignetem Enzymspektrum und praxisnahem, nicht mechanisch aufbereitetem Pflanzenmaterial zurückgeführt, wodurch sich ein Wirkungspotenzial für die Additive ergibt.

Fazit

Allgemein ist festzuhalten, dass die Enzymapplikation bei 4 mm langen, silierten Mais- und Roggenhäckseln keine positive Wirkung auf die spezifische Biogas- und Methanausbeute zeigte, ausgenommen die Variante mit 4 mm langen Maissilagepartikeln und einem Enzymzusatz von Cellulase und Laccase. Positiv beeinflusst wurde die Biogas- bzw. Methanbildung der Energiepflanzen mit einer Länge von 8 mm. Signifikante Differenzen zwischen den Erträgen der unbehandelten und mit Enzym behandelten Substrate waren nicht erzielbar.

Bei dieser Art der Vorbehandlung wurden die höchsten Methanausbeuten mit dem Substrat von 4 mm Länge gemessen. Eine enzymatische Aufbereitung scheint nur günstig, wenn der energetische Input der mechanischen Vorbehandlung auf 4 mm den Enzymkosten wirtschaftlich unterliegt.

Die Methangehalte wurden in unterschiedlichem Maße durch einen Enzymzusatz beeinflusst. Gründe für die differierenden Wirkungen werden in den Abschnitten 4.9.2.2 und 4.9.2.7 angegeben.

Die eingesetzten Enzympräparate wiesen keine Eigengasbildung bzw. keinen Effekt auf die des Faulschlammes auf. Getestet wurde das hydrolytische Enzym A3, welches „die höchste Protein-

konzentration“ aufwies (Daten nicht angegeben), sowie die oxidativ wirkende Laccase. Die Methanausbeute lag bei dem unbehandelten und mit Cellulase behandelten Faulschlamm bei 200 bzw. 198 m³/t oTS. Kam Laccase L zur Anwendung, lag die Methanausbeute des unbehandelten Faulschlammes bzw. des enzymatisch behandelten Faulschlammes bei 244 bzw. 250 m³/t oTS.

4.9.2.5 Abbauverhalten der Lignocellulose während der Methanisierung

Die Enzymleistung wurde neben der Biogaspotenzialmessung durch den Grad des Abbaus an Lignocellulose bestimmt. Aufgrund der analytischen Bedingungen konnte nur die Cellulose innerhalb der Faserstoffklasse nahezu durchgehend erfasst und die Abbauraten der Hemicellulose und des Lignins nur bedingt interpretiert werden.

Die Ergebnisse der Inhaltsstoffanalysen der Substrate, Inokula und Gärrückstände, welche für die Ermittlung der Abbauraten verwendet wurden, sind im Anhang 8.2 aufgeführt.

Abbauraten der während der Silierung enzymatisch behandelten Rohstoffe

Für die während der Silierung enzymatisch behandelten Proben ergeben sich die in Tab. 4-22 dargestellten Abbaugrade in Bezug auf die Biomethanisierung.

Hinsichtlich der Trockensubstanz bzw. die sich darin befindliche organische Trockensubstanz wurde bei den Maissilagen von 2005, unabhängig vom Häckselgrad und der Vorbehandlung, ein Abbaugrad von 45 bis 74 % bzw. 55 bis 79 % nachgewiesen. Geringfügig höhere Abbaugrade bezüglich der Trockensubstanz (TS) und der organischen Substanz (oTS) zeigte die mit Cellulase versetzte Probe mit einer Häckselläge von 4 mm, verglichen mit der unbehandelten Maissilage.

Der verstärkte Abbau der organischen Substanz ist nicht auf einen Lignocelluloseabbau zurückzuführen. Unter Einsatz einer Pektinase oder Mischung aus Cellulase und Pektinase war kein nennenswerter Effekt bezüglich der TS oder oTS nachweisbar. Der Abbau an Cellulose nahm bei den enzymatisch behandelten Silagen im Vergleich mit der unbehandelten Silage ab. Dieser lag bei der Probe mit zugesetzter Enzymmischung unter denen der unbehandelten oder einfach enzymierten Proben. Die Proben mit dem geringsten Abbau an Cellulose während des Biogasprozesses wiesen nach der Silierung die höchste Konzentration an flüchtigen Säuren, Alkoholen sowie Kohlenhydraten⁵² auf.

⁵²Analyseergebnisse siehe Anhang 8.2

Tab. 4-22: Abbaugrad (Mittelwerte) der Trockensubstanz TS, organischen Trockensubstanz oTS, Cellulose, Hemicellulose und des Lignins von den während der Silierung nicht behandelten und vorbehandelten Mais- und Roggensilagen unterschiedlicher Erntejahre und Häcksellängen

	Abbau [%]				
	TS	oTS	Cellulose	Hemicellulose	Lignin ^x
Erntejahr 2005					
Maissilage 4 mm	66	72	70	50	0
Maissilage + B3	72	79	68	0	0
Maissilage + B4	66	73	67	9	0
Maissilage + B3/B4	68	72	57	3	0
Maissilage 8 mm	74	79	64	69	0
Maissilage + B3	60	69	51	0	0
Maissilage + B4	45	58	61	0	0
Maissilage + B3/B4	53	55	56	69	0
Erntejahr 2006					
Maissilage 4 mm	73	81	82	69	7
Maissilage + A3/B4	85	83	86	84	88
Maissilage + A3/L	69	77	98	53	40
Maissilage + B4/L	66	72	73	-	0
Maissilage 8 mm	53	67	75	80	0
Maissilage + A3	68	76	62	-	0
Maissilage + B4	57	70	78	75	0
Maissilage + L	51	68	80	79	18
Maissilage + A3/B4	30	54	89	5	-
Maissilage + A3/L	51	73	84	33	30
Maissilage + B4/L	13	33	86	81	0
Maissilage + A3/B4/L	77	81	90	0	-
Roggensilage 4 mm	28	35	66	-	0
Roggensilage + A3/B4	0	13	52	-	0
Roggensilage + A3/L	0	0	-	-	-
Roggensilage + B4/L	5	31	-	-	-
Roggensilage 8 mm	0	0	46	-	0
Roggensilage + A3	6	34	44	-	0
Roggensilage + B4	0	0	40	-	0
Roggensilage + L	0	1	37	-	0
Roggensilage + A3/B4	6	20	45	-	0
Roggensilage + A3/L	0	0	41	-	0
Roggensilage + B4/L	20	33	61	-	0
Roggensilage + A3/B4/L	0	0	0	-	0
Erntejahr 2007					
Roggensilage 8 mm	26	45	75	-	0
Roggensilage + B4/L-1	60	66	56	-	0
Roggensilage + A3/B4-1	36	48	59	-	0
Roggensilage + A3/B4/L-1	28	41	57	-	0
Roggensilage + B4/L-2	64	70	81	-	0
Roggensilage + A3/B4-2	49	56	81	86	21

	Abbau [%]				
	TS	oTS	Cellulose	Hemicellulose	Lignin ^x
Roggensilage + A3/B4/L-2	59	65	81	86	29

A3 = Cellulase, B3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase, Enzym-1 = 0,07 g Enzym/kg Roggen, Enzym-2 = 0,14 g Enzym/kg Roggen, ^x0 = kein Abbau, Aufkonzentration

Der Enzymzusatz dürfte zu einem verstärkten Abbau von Biopolymeren sowie einer verstärkten Säure- und Alkoholbildung während der Silierung geführt haben, wodurch eine hohe Quantität an leicht vergärbaren Molekülen vorlag bzw. freigesetzt wurde. Dementsprechend wurde eine Vielzahl an flüchtigen Fettsäuren in den Prozess eingebracht. Das führte zu einer Akkumulation von flüchtigen Fettsäuren und folglich einer verlangsamten Versäuerung. Dies wird durch Untersuchungen von Borzacconi *et al.* [1997] bestätigt. Beim anaeroben Abau von Siedlungsabfällen konnte nachgewiesen werden, dass eine Inhibierung während der acidogenen Phase durch eine Akkumulation von flüchtigen Fettsäuren bei dem Reaktor stattfand, welcher mit einem höheren Anteil an leicht abbaubarer Substanz gefüttert wurde. Ebenso sind flüchtige Fettsäuren in Abhängigkeit von der Konzentration Inhibitoren der Cellulosekonversion. Die Resultate von Feng *et al.* [2012] weisen darauf hin, dass Ameisensäure einen signifikanten Einfluss auf die Enzymaktivität der Cellulase besitzt und Bakterienzellen abtötet. In Folge dessen nimmt die Cellulosekonversion ab. Demnach kann bereits bei der vorausgegangenen Hydrolysephase die Konversion der Lignocellulose negativ beeinflusst werden und die Inhibitionen während der genannten Prozessphasen zu einem schwächeren Abbau der Polymere während der Biomethanisierung führen. Denkbar ist weiterhin, dass die in den Prozess eingebrachten Kohlenhydrate hydrolytische Enzyme der ersten Prozessphase während der Biogasbildung inhibierten. Xiao *et al.* [2004] konnten bei enzymatischen Hydrolysen von Weichholzsubstraten nachweisen, dass Glucose ab einer bestimmten Konzentration die Aktivitäten von Cellulase und β -Glucosidase inhibierten. Auch Mannose, Xylose und Galactose zeigten eine signifikante Hemmwirkung auf die Cellulaseaktivität. Die zuvor genannten Gründe erklären auch die geringeren Abbauraten bei den enzymatisch behandelten Häckseln mit einer Länge von 8 mm, verglichen mit der Kontrollvariante.

Die unbehandelten Proben der Maissilage des darauf folgenden Jahres (2006) mit einer Häcksel-länge von 4 mm wiesen einen höheren Abbaugrad bezüglich der Trockensubstanz und Faserstoffe auf. Bei den 8 mm langen Häcksel sind ein höherer Abbau bei den Faserstoffen und ein geringerer Umsatz an Trockensubstanz sowie organischer Trockensubstanz erkennbar. Demnach könnte die Lignocellulose bei den Maissilagen des Erntejahres 2006 im Vergleich zu den Maissilagen von 2005 mikrobiell leichter zugänglich sein.

Die Abbaugrade für die Trockensubstanz und die organische Trockensubstanz lagen unabhängig vom Häckselgrad und der Vorbehandlung zwischen 13 und 85 % bzw. 33 und 83 %. Durch den Zusatz einer Mischung aus Cellulase und Pektinase konnte bei den 4 mm langen Häckseln eine stärkere Umsetzung der Faserstoffe bzw. der Trockensubstanz im Vergleich mit der unbehandelten Variante nachgewiesen werden. Die Probe wies den höchsten Hemicelluloseabbau unter den 4 mm-Varianten auf. Cellulose wurde in höchstem Maße durch die Dotierung von Cellulase und Laccase zum Mais mit einer Häcksellänge von 4 mm umgesetzt. Trotz erhöhtem Faserabbau zeigte die genannte Probe eine geringe Abnahme beim Trockensubstanzabbau. Gleiches wies Kaiser [2004] mit enzymatisch vorbehandelter Maissilage nach. Die Probe Maissilage 4 mm + A3/B4 mit dem höchsten Gesamtsäure- und Alkoholgehalt⁵³ nach der Silierung wies den höchsten Umsatz an organischer Substanz sowie der Lignocellulose während des Biogasprozesses auf. Einen vergleichbaren Effekt, welcher gegensätzlich zu den Maissilagen von 2005 war, zeigte sich bei den 8 mm langen Häckseln. Die höchste Konzentration an Gesamtsäure und Kohlenhydraten⁵³ nach der Silierung sowie den stärksten Umsatz an Substanz während der Biogasbildung wies die Probe mit der zugesetzten Dreifachmischung an Enzymen auf. Die bei den Maissilagen unterschiedlicher Erntejahre entgegenstehenden Effekte können u. a. durch unterschiedlich eingesetzte Enzymkonzentrationen und -arten sowie Biozönosen im Gärtest oder unterschiedliche und folglich abweichende Konversions- und Inhibierungsprozesse erklärt werden. Weiterhin war bei den Häckseln mit einer Länge von 8 mm unter Zusatz einer Pektinase die Abbaurate an Trockensubstanz, organischer Trockensubstanz und Cellulose im Vergleich zur Kontrollvariante höher. Auch durch den Zusatz von Laccase, Cellulase und Pektinase, Cellulase und Laccase oder Pektinase und Laccase konnte der Abbaugrad an Cellulose im Biogasprozess erhöht werden.

Für die Maissilage mit einer Häcksellänge von 8 mm, welche mit einer Mischung aus A3/B4 oder A3/B4/L versetzt wurde, wurde ein unrealistischer Abbaugrad an Lignin von über 100 % ermittelt, in der Tab. 4-22 konnte kein Ergebnis angegeben werden. Die ermittelte Ligninkonzentration kam dessen ungeachtet zur Ermittlung des Celluloseabbaus zum Einsatz.

Die Resultate der chemischen Analysen⁵⁴ der Roggensilagen von 2006 sowie die berechneten Abbaugrade ausgewählter lignocellulosischer Bestandteile lassen vermuten, dass die Analysen, methodisch begründet, keine gesicherten Ergebnisse lieferten. Das ist beispielsweise auf die starke Inhomogenität der Gärrückstände zurückzuführen. Es konnte beispielsweise kein Abbau an Trockensubstanz und Faserstoffen bei der Probe mit dem Zusatz einer Dreifachmischung ge-

⁵³Analyseergebnisse siehe Anhang 8.2

⁵⁴Analyseergebnisse siehe Anhang 8.2

messen werden. Die Konzentration an Hemicellulose war aufgrund unzureichender Probenmengen des Gärückstandes vom Faulschlamm für eine NDF-Analyse nicht bestimmbar.

Die ermittelten Abbaugrade der Roggensilagen lagen u. a. aufgrund höherer Anteile an schwer abbaubaren Substanzen wie Lignocellulose im Vergleich mit denen der Maissilagen niedriger.

Die unbehandelte, auf 4 mm gehäckselte Roggensilage wurde während des Biogasprozesses im Hinblick auf die Trockensubstanz, organische Trockensubstanz bzw. Cellulose zu 28, 35 bzw. 66 % umgesetzt. Durch den Zusatz von Enzympräparaten konnte keine Zunahme des Faserabbaus ermittelt werden. Ein Celluloseabbau von 46 % war unter Anwendung des unbehandelten Substrates mit einer Häcksellänge von 8 mm nachzuweisen. Dieser lag damit unter dem der Roggensilage mit einer Häcksellänge von 4 mm. Bei den Proben, welche mit Enzympräparaten versetzt wurden, waren 37 bis 61 % Celluloseabbau messbar. Ein Zusatz von Cellulase oder Cellulase und Pektinase sowie Pektinase und Laccase bedingte vermutlich einen verstärkten Abbau sowohl bei der Trockensubstanz bzw. organischer Trockensubstanz als auch der Cellulose. Die höchsten Abbauraten wies die Roggensilage mit einer Dotierung von Pektinase und Laccase auf, welche über denen der Kontrollvariante lagen.

Die Trockensubstanz, organische Substanz und die Cellulose wurden in höherem Maße bei der nicht vorbehandelten Roggensilage von 2007 im Vergleich mit der Roggensilage von 2006 abgebaut. Allgemein lag bei den Proben der Roggensilage von 2007 der Abbaugrad an Trockensubstanz bzw. organischer Trockensubstanz bei 26 bis 64 %. Durch die zugesetzten Enzymmischungen in einer Konzentration von 0,07 g/kg FM Roggen konnte die Abbaurate an Trockensubstanz und organischer Trockensubstanz erhöht werden, ausgenommen die Probe mit einem Zusatz an A3/B4/L. Cellulose wurde in geringerem Maße, verglichen mit der Kontrollvariante, abgebaut. Bei Verdopplung der Enzymkonzentration konnte im Vergleich zur unbehandelten Variante und zu den Varianten mit einer geringeren Enzymdosis eine Zunahme der Degradation bezüglich aller gemessenen Parameter erzielt werden. Wie bei der Roggensilage von 2006 lagen die Abbauraten der Trockensubstanz, organischen Trockensubstanz und Cellulose mit einer Mischung aus Pektinase und Laccase über denen der unbehandelten und weiteren mit Enzym versetzten Proben.

Abbauraten der direkt vor dem Biogasprozess enzymatisch behandelten Silage

Der Abbau an Trockensubstanz bzw. organischer Trockensubstanz lag bei den untersuchten Proben zwischen 36 und 71 % bzw. 38 und 73 % (Tab. 4-23). Cellulose wurde in hohem Maße von 70 bis 91 % während der Biogasproduktion abgebaut. Der Zusatz einer Enzymmischung zur nicht behandelten oder pasteurisierten Silage führte zu einer verminderten Umsetzung der

Trockensubstanz und organischen Trockensubstanz. Der Celluloseabbau der genannten Proben war gleich demjenigen der Kontrollvariante. Die mit Wasser versetzten Silagen zeigten einen gesteigerten Abbau an Trockensubstanz, organischer Trockensubstanz und Cellulose, verglichen mit der nicht behandelten Probe. Die stärkste Verwertung an Faserstoffen - Cellulose und Lignin - während der Biogasbildung konnte bei der Probe mit einem Zusatz an Wasser und Enzym gemessen werden. Wie bereits in Abschnitt 4.9.2.3 beschrieben, führt ein Wasserzusatz zum Quellen der Lignocellulose-Matrix, danach zum partiellen Abbau und folglich werden Polysaccharide leichter zugänglich für die Enzyme.

Tab. 4-23: Abbaugrad (Mittelwerte) der Trockensubstanz TS, organischen Trockensubstanz oTS, Cellulose, Hemicellulose und des Lignins von den direkt vor dem Biogasprozess nicht behandelten und vorbehandelten Roggensilagen des Erntejahres 2007 mit einer Häcksellänge von 8 mm

	Abbau [%]				
	TS	oTS	Cellulose	Hemicellulose	Lignin
Roggensilage 8 mm	50	55	72	-	47
Roggensilage + P	54	59	-	-	-
Roggensilage + W	71	73	86	-	24
Roggensilage + E	36	38	71	-	0
Roggensilage + P/W	67	69	81	-	41
Roggensilage + P/E	38	40	70	-	75
Roggensilage + W/E	59	58	91	-	69
Roggensilage + P/W/E	65	70	88	-	29

P = 90 °C, 1 bar, 20 Min; E = Enzym = A3 + B4, 1 kg je Enzym/t TS Roggen; Wasser = 350 g Silage + 350 g Wasser

Abbauraten der während des Biogasprozesses enzymatisch behandelten Silagen

Die Ergebnisse des Abbauverhaltens der Lignocellulose während der Biogasbildung von den während des Biogasprozesses enzymatisch behandelten Silageproben sind im Abschnitt 4.8.1 aufgeführt und diskutiert.

4.9.2.6 Cellulose als Indikator der Vergärbarkeit von Energiepflanzen

Cellulose scheint ein geeigneter Indikator der Vergärbarkeit von Substraten zu sein. Bereits im Jahr 2000 verwendeten zum Beispiel Scherer *et al.* den Celluloseabbau als Kenngröße für den Feststoffabbau im Biogasprozess von Abprodukten. Myint *et al.* [2007] wiesen zudem in Fermentationen von Rindergülle nach, dass der signifikante Parameter bei der Hydrolyse/Acidogenese-Phase die Hydrolysegeschwindigkeitskonstante der Cellulosefraktion ist.

In der Abb. 4-34 sind mögliche Wege des anaeroben Celluloseabbaus dargestellt. Die daran beteiligten Mikroorganismen werden nach Scherer *et al.* [2009] den Bacteriodales, Clostridiales, Spirochaetes und Methanobacteriales zugeordnet.

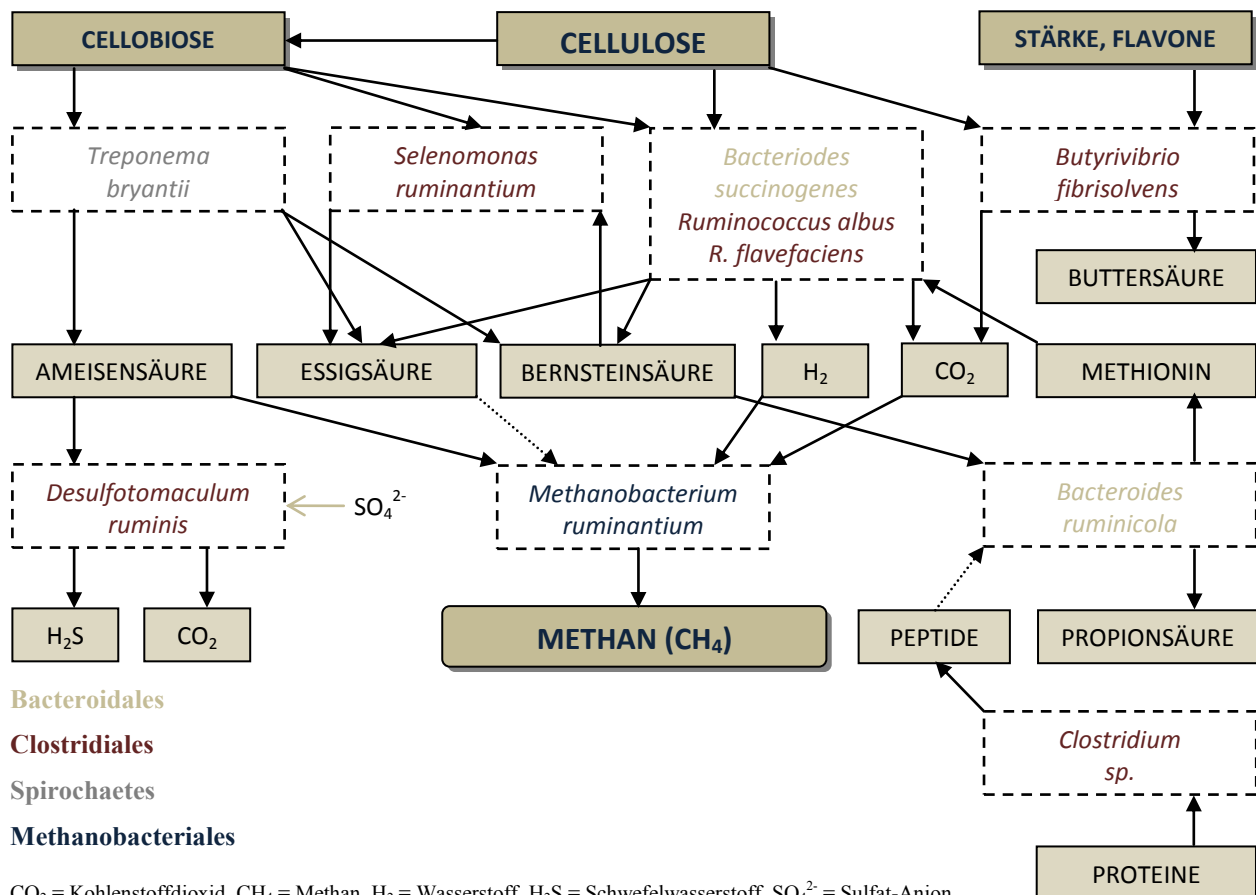


Abb. 4-34: Anaerober Celluloseabbau [nach Scherer et al. 2009]

Sowohl während der Silierung als auch der Methanbildung wird Cellulose anteilig verstoffwechselt. Durch die Messung der Konzentration an Trockensubstanz und der Bestandteile der Lignocellulose in den Input- und Outputmaterialien⁵⁵ der verschiedenen Prozesse konnte bezüglich der Cellulose eine Stoffbilanzierung⁵⁶ über den gesamten Prozess für die Proben, welche während der Silierung oder direkt vor dem Biogasprozess vorbehandelt wurden, erstellt werden.

Die Abbauraten der Cellulose lagen unter Berücksichtigung der Gesamtheit an Proben in einem Bereich von 39 bis 98 %. Der Zusatz ausgewählter Enzymmischungen führte in jeder untersuchten Prozessstufe zu einem gesteigerten Konversionsgrad von Cellulose. Für eine enzymatische Behandlung von Roggensilage direkt vor dem Biogasprozess war zusätzlich eine Wassergabe notwendig. Bei der enzymatischen Behandlung während der Silierung, direkt vor dem Biogasprozess bzw. während des Biogasprozesses konnte eine Steigerung im Vergleich zur Kontrollvariante von bis zu 15, 19 bzw. 14 Prozentpunkten gemessen werden. Wurde eine enzymatische Vorbehandlung vor der Methanisierung durchgeführt, war mit Abbauraten von über 90 % zu rechnen. Eine Steigerung des Celluloseumsatzes um 14 Prozentpunkte und damit ähnlich den

⁵⁵Analyseergebnisse siehe Anhang 8.2

⁵⁶Ergebnisse siehe Anhang 8.5

Steigerungsraten der enzymatischen Behandlungen konnte durch den Zusatz von Wasser zur Roggensilage während der Hydrolyse erzielt werden. Zum verstärkten Abbau von Cellulose dürften die in der eigenen Arbeit angewendeten Enzymmischungen Cellulase und Laccase, Pektinase und Laccase sowie Cellulase, Pektinase und Laccase geeignet sein.

Die während der Silierung unbehandelten und enzymatisch behandelten Proben der Maissilage von 2006 sowie die der Roggensilage von 2007 konnten während der Biogasbildung von den Mikroorganismen besser verstoffwechselt werden als die Silagen der Vorjahre, erkennbar an den Abbaugraden der Cellulose.

Die unbehandelten und enzymatisch behandelten Proben der Maissilage von 2005 wiesen einen Abbau an Cellulose von 55 bis 71 % auf. Der Celluloseabbau der Proben der Maissilage des darauf folgenden Jahres lag bei 73 bis 98 %. Die Bilanzierung zeigt, dass die Abbaugrade der Varianten der Maissilage von 2006 höher liegen als die der Maissilage von 2005. Das silierte und nicht behandelte Substrat des Jahres 2006, sowohl mit einer Häcksellänge von 4 als auch mit einer Länge von 8 mm, lag bezüglich des Celluloseabbaus um 14 % höher als im Jahr zuvor. Es ist davon auszugehen, dass strukturelle Unterschiede in der Lignocellulose zwischen den Maissilagen von 2005 und 2006 zu einer besseren Zugänglichkeit der einzelnen lignocellulosischen Bestandteile bei den Maissilagen von 2006 geführt haben.

Die Stoffbilanzierung der Cellulose bei den enzymatisch behandelten Maissilagen von 2005 ergab, dass der Zusatz von Enzymen den Celluloseabbau nicht verstärken konnte. Die positive Wirkung bei der Silierung wurde durch den verminderten Abbau an Cellulose während der Biomethanisierung kompensiert.

Der Zusatz an Einzel- oder Mischenzympräparaten zum Mais von 2006 bewirkte einen verstärkten Abbau der Cellulose, ausgenommen die Proben mit einer Häcksellänge von 4 mm und einem Zusatz an Pektinase und Laccase oder 8 mm mit einem Zusatz an Cellulase. Die Probe (4 mm) mit einer zugesetzten Mischung aus Pektinase und Laccase zeigte sowohl nach der Silierung als auch im Zuge der Biogasproduktion einen geringeren Celluloseabbau, verglichen mit der unbehandelten Probe. Der Zusatz von Cellulase führte während der Silierung zu einem Anstieg des Celluloseumsatzes und während der Biogasproduktion zu einer Abnahme. In Folge dessen gab es bei den genannten Proben einen geringeren Gesamtumsatz an Cellulose als bei der Kontrollvariante.

Die Abbaugrade lagen bei den unbehandelten und behandelten Roggensilagen von 2006 bzw. 2007 in einem Bereich von 39 bis 66 % bzw. 61 bis 82 %. Die nicht behandelten Proben der Roggensilage von 2007 wiesen eine bessere Vergärbarkeit gegenüber denen des Jahres 2006 mit

einer Differenz von 30 % auf. Die Cellulosefraktion des Roggens von 2007 war zugänglicher für den mikrobiellen Abbau als die des Roggens von 2006. Folglich ist das Potenzial für die Wirkung der zugesetzten Enzympräparate geringer. Unter Einsatz von Cellulase und Pektinase oder Pektinase und Laccase beim Roggen des Erntejahres 2006 mit einer Häcksellänge von 8 mm war eine Steigerung des Celluloseabbaus erreichbar. Im ersten Fall ist es auf einen verstärkten Celluloseumsatz bei der Silierung und im zweiten Fall auf einen erhöhten Abbau an Cellulose bei der Biogasproduktion zurückzuführen. Bei den enzymatisch vorbehandelten Roggensilagen von 2007 stiegen die Abbaugrade an Cellulose sowie die spezifischen Biogas- und Methanausbeuten nur unter Einsatz einer höheren Enzymdosis von 0,14 g/kg bei den gewählten Enzymmischungen an. Die Ursache dafür ist in einem verstärkten Celluloseumsatz während der Biogasproduktion zu sehen.

Aufgrund der vergrößerten Oberfläche der Partikel durch eine Zerkleinerung von 8 auf 4 mm war zu erwarten, dass letztere einen verstärkten Abbau an Faserstoffen bzw. Cellulose aufweisen. Durch die Stoffbilanzierung wurde diese Annahme für den Parameter Cellulose in Bezug auf die unbehandelten Substrate bestätigt.

Auch im Fall der direkt vor dem Biogasprozess enzymatisch behandelten Silage lässt sich der Abbau an Cellulose bilanzieren. Einbezogen wurde der Abbau an Cellulose⁵⁷ während der Vorbehandlung sowie des Biogasprozesses. Die mit Wasser versetzten Proben erzielten hohe Abbauraten von über 80 %. Der höchste Abbau mit 91 % wurde bei der Roggensilage mit einer Vorbehandlung durch Wasser und einer Enzymmischung erzielt. Nicht mit Wasser versetzte Proben wiesen einen Abbau gleich der Kontrolle auf.

Neben der Vergärbarkeit von Substraten scheint der Cellulosegehalt bzw. -abbau auch einen Hinweis darauf zu geben, ob ein Potenzial für die Wirkung von Enzymen gegeben ist.

In der Literatur sind keine Aussagen zu finden, welche den Abbau der Lignocellulose bzw. eine Massenerfassung der Cellulose über den Gesamtprozess bei einer enzymatischen Behandlung von Energiepflanzen während der Silierung oder der Silage direkt vor dem Biogasprozess beinhalten.

⁵⁷Ergebnisse siehe Anhang 8.5

4.9.2.7 Einfluss der Methodik der enzymatischen Behandlung auf den Biogasprozess

Einfluss der Methodik der Enzymierung auf die spezifische Biogas- und Methanausbeute

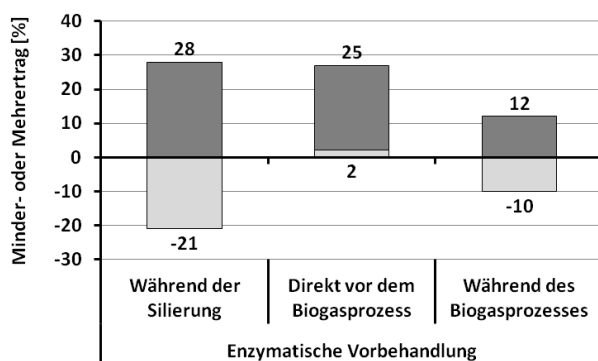


Abb. 4-35: Minimum und Maximum der erzielten Minder- und Mehrerträge bezogen auf die Methanausbeute [m³/t FM] für die angewendeten Methoden der Enzymierung

Bei den Versuchen zur enzymatischen Behandlung während der Silierung wurden für die eingesetzten unbehandelten und behandelten Mais- und Roggensilagen Methanausbeuten von 70 bis 125 m³/t FM mit Minder- und Mehrerträgen an Methan durch den Enzymeinsatz von -21 bis +28 % gemessen. Mit einem wesentlich geringeren Umfang an Proben bei der nachfolgenden Versuchsreihe wurde bei der Roggensilage, welche nicht oder direkt vor dem Biogasprozess vorbe-

handelt wurde, ein Methanertrag im Bereich von 87 bis 108 m³/t FM und Mehrerträge von +2 bis +25 % erzielt. Wurde Mais- oder Roggensilage während des Biogasprozesses enzymatisch behandelt, ergaben sich für die Kontrollvarianten und mit Enzym versetzten Varianten Methanausbeuten von 91 bis 110 m³/t FM. Die Minder- und Mehrerträge an Methan lagen bei -10 bis +12 %. Einen vergleichenden Überblick gibt Abb. 4-35.

In der Tab. 4-24 werden die Vorzugsvarianten, bezogen auf die Methanausbeuten oder Methanmehrerträge, der einzelnen Silagen und Methodiken aufgeführt.

Tab. 4-24: Vorzugsvarianten der einzelnen Behandlungsmethoden

Methodik der Enzymierung	Substrat (Erntejahr)	Vorzugsvariante Methanausbeute [m³/t FM]		Vorzugsvariante Mehrertrag an Methan [%]	
		Häcksellänge	Enzymzusatz	Häcksellänge	Enzymzusatz
Enzymierung während der Silierung	Maissilage (2005)	8 mm	B4	8 mm	B4
	Maissilage (2006)	4 mm	ohne Enzym	k.M.	k.M.
	Roggensilage (2006)	8 mm	A3/B4/L	8 mm	A3/B4/L
	Roggensilage (2007)	8 mm	A3/B4-2	8 mm	A3/B4-2
Enzymierung direkt vor dem Biogasprozess	Roggensilage (2007)	8 mm	W	8 mm	W
Enzymierung während dem Biogasprozess	Maissilage (2006)	4 mm	A1/L	8 mm	A1/B1
	Roggensilage (2006)	4 mm	ohne Enzym	8 mm	A1/B1/L

k.M. = kein Mehrertrag nachgewiesen, A3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase, A1 = Cellulase, B1 = Pektinase, W = Wasser, Enzym-2 = 0,14 g Enzym/kg Roggen

Bei der enzymatischen Behandlung der Rohstoffe während der Silierung konnten durch den Einsatz einer Pektinase oder dieser in Mischung mit einer Cellulase, bis auf die Maissilage von 2006, die höchsten Ausbeuten und Mehrerträge erzielt werden. Im Fall der Roggensilage von 2006 ist trotz einer signifikanten Steigerung der Methanausbeute durch den Zusatz einer Mischung aus Cellulase, Pektinase und Laccase, die Mischung ohne Laccase aus ökonomischen Gründen vorzuziehen (Abschnitt 4.11). Die Enzympräparate sind bei Substraten mit einer Häcksellänge von 8 mm einzusetzen. Bei einer Reduktion der Häcksellänge von 8 auf 4 mm war keine relevante Steigerung der Methanausbeute durch einen Enzymzusatz gegeben. Bei der Maissilage von 2006 führte dies dazu, dass das unbehandelte Material mit einer Häcksellänge von 4 mm die höchste Methanausbeute erbrachte. Dem gleichend, wurde bei dem Einsatz von Enzympräparaten während der Biogasproduktion bei der Roggensilage von 2006 die höchste Methanausbeute unter Verwendung des unbehandelten und eine Partikellänge von 4 mm aufweisenden Materials gemessen. Bei der enzymatisch vorbehandelten Maissilage von 2006 mit einer Häcksellänge von 4 mm war eine höhere Methanausbeute im Vergleich mit dem unbehandelten oder mit Enzym versetzten Substrat, welches auf 8 mm zerkleinert wurde, erzielbar. Betrachtet man die Vorzugsvarianten, welche aufgrund der Mehrerträge ermittelt wurden, ist bei der Mais- bzw. der Roggensilage von 2006 mit einer Häcksellänge von 8 mm der Einsatz von Enzymmischungen aus Cellulase und Pektinase bzw. Cellulase, Pektinase und Laccase während des Biogasprozesses am wirkungsvollsten.

Aus ökonomischer Sicht ist der Einsatz der Mischungen nicht sinnvoll, da die Pektinase als Einzelpräparat die Methanausbeute derart erhöhte, dass der Einsatz eines weiteren Enzyms aus Kostengründen wenig effektiv ist. Das pektinolytische Enzympräparat mit cellulolytischen und hemicellulolytischen Nebenaktivitäten ist den Enzymmischungen vorzuziehen. Der Einsatz einer Pektinase zeigte sowohl beim Einsatz während der Silierung als auch im Biogasprozess eine positive Wirkung.

Beim Einsatz des pektinolytischen Präparates B1 während des Biogasprozesses können unter geringstem Aufwand Methanertragssteigerungen bei der Vergärung von Mais- und Roggensilage mit einer Häcksellänge von 8 mm erzielt werden. Im Rahmen der eigenen Arbeiten konnte zudem gezeigt werden, dass der Einsatz der Pektinase B1 als Einzelpräparat bei einer Verlängerung der Verweilzeit von 35 auf 65 d die Methanausbeute deutlich steigerte (Ergebnisse nicht dargestellt). Eine Verweilzeit von 65 Tagen entspricht praxisüblichen Bedingungen. Die Differenz der Methanerträge zwischen der Silage mit dem Zusatz einer Pektinase und der Silage mit einer Enzymmischung (A1/B1; A1/B1/L) verminderte sich. Im Fall der Maissilage von 2006 waren die Methanausbeuten der mit Pektinase B1 versetzten Probe und der in Tab. 4-24

genannten Vorzugsvariante identisch. Die Mehrerträge der mit Cellulase und Pektinase versetzten Silage bzw. der nur mit Pektinase versetzten Silage (je 8 mm) stiegen von 12,2 auf 15,7 % bzw. 9,2 auf 15,3 %. Die positive Wirkung der pektinolytischen Präparate kann darin begründet sein, dass das Pektin als „Klebstoff“ der Lignocellulose von den Enzympräparaten depolymerisiert wird, und die Bestandteile der Lignocellulose für die Mikroorganismen bzw. Enzyme des Biogasprozesses zugänglicher werden. Versuche von Faulstich & Schieder [2008] zur Viskositätssenkung bzw. Verflüssigung von Maissilage belegen, dass der Einsatz einer Pektinase in technischer und ökonomischer Hinsicht, verglichen mit einer Cellulase oder Amylase, die besten Ergebnisse zeigte. Es ist möglich, dass durch die hervorgerufene Viskositätssenkung aufgrund des Abbaus von Pektinen, also Gelbildnern, die Mikroorganismen sowie die Enzyme im wässrigeren System leichter Zugang zu Pflanzeninhaltsstoffen finden. Verschiedene Autoren wie Fondevila *et al.* [2002] oder Patel *et al.* [1992] berichteten, dass im Fermentationsprozess von Stroh oder Wasserhyazinthe supplementiertes und folglich im Prozess frei vorliegendes Pektin die Methanausbeute erhöhte. Die Ausbeute stieg mit zunehmender Pektinkonzentration. Das heißt, dass dem Prozess zugeführtes Pektin, ob enzymatisch freigesetzt oder dotiert, die Methanausbeute positiv beeinflussen kann. Auch Untersuchungen an der Universität Münster [Anonymus, 1999] bestätigen, dass der Einsatz von Pektinasen von Bedeutung ist. Es wurde ermittelt, dass Pektinasen in der Natur eine entscheidende Rolle beim Abbau der Lignocellulose spielen. Die äußere Schicht einer Zellwand stellt die Mittellamelle dar, welche hauptsächlich aus Pektin besteht. Daher ist das erste hydrolytische Enzym, das von vielen Pflanzenpathogenen (z. B. bei holzabbauenden Pilzen) gebildet wird, eine Pektinase. Neben der Pektinase beinhaltet das Enzympräparat B1 Hemicellulase. Diese ist in der Lage, einen bestimmten Anteil an Hemicellulose, eine weitere Kittsubstanz im Netzwerk der Lignocellulose, während des Einsatzes im Biogasprozess abzubauen (siehe Abschnitt 4.8.1). Daher lässt sich die These formulieren, dass vor allem der Abbau von Kittsubstanzen der Lignocellulose zur Steigerung der Methanausbeute während der Biogasbildung führt.

Herrmann [2010] konnte in umfangreichen Versuchsreihen unter Anwendung von z. B. Mais mit unterschiedlichen Häcksellängen zeigen, dass bei einer Einstellung der Häcksellänge am Feldhäcksler von unter 7 mm die Methanausbeute gesteigert werden konnte. Aber aufgrund des Mehraufwandes für Energie und der Änderung von Kapazitäten in Ernteprozessketten kann dies zu einer Minderung der Netto-Energieproduktion sowie des ökonomischen Gewinnes im Vergleich mit praxisüblichen Häcksellängen führen. Es wurde eine Länge des Häckselgutes von 7-8 mm empfohlen. Anhand der Literaturergebnisse und den eigenen Ergebnissen ergibt sich,

dass der Einsatz der Enzympräparate bei Häckseln mit einer Länge von 8 mm der Zerkleinerung auf 4 mm vorzuziehen ist.

Der während einer Vorhydrolyse von Roggensilage geprüfte Wasserzusatz konnte die Methan- ausbeute in stärkerem Maße steigern als der Einsatz einer Enzymmischung aus Cellulase und Pektinase. Aufgrund der hohen Methanerträge und Mehrerträge sollten die Untersuchungen zum Wassereinsatz fortgeführt und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ermittelt werden.

Mögliche Ursachen einer fehlenden Wirkung der Enzympräparate im Biogasprozess

Verschiedene Ursachen können dazu führen, dass eine Enzymwirkung ausbleibt oder ein negatives Ergebnis durch den Enzymeinsatz bei den ausgewählten Substraten vorlag. Diese sind im Folgenden stichpunktartig zusammengefasst:

- Das Substrat ist im nativen Zustand bereits ausreichend vergärbar. [Lebuhn *et al.*, 2010; Wulf & Clemens, 2009]
- Frühzeitige Inaktivierung der Enzyme im Fermenter: Nachlassen der katalytischen Wirkung der Enzyme aufgrund der in dem Inokulum enthaltenen Gehalte an Ammoniak und Salzen. [Wulf & Clemens, 2009]
- Die zugesetzten Enzympräparate werden durch eine Substrat- oder Produktinhibierung oder eine irreversible Adsorption am Substrat inaktiviert [Mansfield *et al.*, 1999]. Der Grad sowie der Typ der Enzyminhibierung sind beim Lignocelluloseabbau abhängig von der Biomassezusammensetzung, der Vorbehandlungsart und den Reaktionsbedingungen. [Ximenes *et al.*, 2010]
- Abbau der Enzyme durch sekretierte Proteasen von Mikroorganismen der anaeroben Prozesse. [Lebuhn *et al.*, 2010]
- Zu Beginn der Biogasbildung stehen ausreichend leicht vergärbare Substrate im Gärmedium zur Verfügung, so dass ein Enzymzusatz zu einem späteren Zeitpunkt sinnvoll erscheint. [Schuhmann, 2007]

Mögliche Inhibierungen während der Biogasproduktion

Die Silierung unter Einsatz von Enzymen mit anschließender Vergärung führte in einigen Fällen zu beträchtlichen Mindererträgen an Methan. Auch der Einsatz von Enzymmischungen bei der Vergärung von auf 4 mm gehäckselten Silagen führte in den meisten Fällen zu einer geringen Enzymwirkung oder zu einem Minderertrag. Es ist offensichtlich, dass die Mindererträge vorwiegend auf eine Inhibierung der Biogasbildung durch Bestandteile der Lignocellulose zurückzuführen sind. Viele Bestandteile der Lignocellulose sowie deren Abbauprodukte wie Xylan,

Pektin, Cellobiose, Glucose, Xylose, Arabinose und D-Glucuronsäure besitzen ein inhibierendes Potenzial bezüglich enzymatischer Umsetzungen und demzufolge der Biogasbildung. [Ximenes *et al.*, 2010, Gruno *et al.*, 2004, Gong *et al.*, 1977]

Phenolische Komponenten, Abbauprodukte von Lignin, sind nach Hernandez & Edyvean [2008] sowie Ximenes *et al.* [2010] die stärksten Inhibitoren der Enzymproduktion verschiedenster Mikroorganismen, eingeschlossen die Aktivitäten der von diesen generierten Enzymen. Cellulasen, β -Glucosidasen und Hemicellulasen werden in ihrer Funktion beeinflusst. Von Ximenes *et al.* [2010] wurde in Hydrolyseversuchen gezeigt, dass Bestandteile des Lignins wie Vanillin und trans-Zimtsäure die Cellulose- und Cellobiosehydrolyse bzw. die untersuchten Cellulasen und β -Glucosidasen inhibieren können. Hernandez & Edyvean [2008] untersuchten die Wirkung verschiedener Phenole und Phenolsäuren auf den Biogasprozess. Diese können die Konversion schnell abbaubarer organischer Fraktionen und den eigenen Abbau inhibieren. Einer anfänglichen Erhöhung der Biogasproduktion folgte eine Inhibierung der Gasbildung. Dabei wurde die Inhibierung durch phenolische Komponenten beeinflusst in Verbindung mit folgenden Parametern: Autoxidation, Apolarität, Typ, Größe und Anzahl an Substituenten. Die im Anschluss aufgeführten Mechanismen beschreiben unterschiedliche Inhibierungstypen durch phenolische Komponenten:

- Störung der trophischen Kette zwischen Mikroorganismen: Beeinflussung der Produktion von Fettsäuren, Wasserstoff und folglich Methan. [Wang *et al.*, 1989; Fedorak & Hrudey, 1984]
- Inhibierung der elektrochemischen Protonengradienten von Zellmembranen: Reduktion des Elektronentransportes und der Energieproduktion. [Escher *et al.*, 1996]
- Inhibierung der bakteriellen Aktivität durch die Wechselwirkung von Phenolen und den Proteinen der Zellmembran, wobei zunächst Kondensate an den oxidierten Phenolen und Proteinen gebildet werden und erstere dann polymerisieren. Zudem können Phenolcarbonsäuren über Protonierungen von Aminofunktionen die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Phenolen nachhaltig beeinflussen, z. B. im Zuge von Autolysen. [Wingender *et al.*, 1999; Haslam, 1988]

Hernandez & Edyvean [2008] schlussfolgerten, dass die Hydrolyse und Acetogenese in höherem Maße inhibiert werden als die Methanogenese, da z. B. Phenol oder Brenzcatechin toxischer auf den Gesamtprozess der Vergärung wirkten als bei der Methanogenese von Acetat.

Nicht-produktive Enzymbindungen an Lignin führen ebenso zur Inhibition hydrolytischer Enzyme. Diese Zellwandbestandteile werden von Pflanzen gebildet, um sich gegen hydroly-

tische Enzyme wie Cellulasen von Pathogenen zu schützen. [Palonen & Viikari 2004; Ximenes *et al.*, 2010]

Eine starke Beeinflussung der Methanausbeute durch Lignin konnte auch in den eigenen Versuchen nachgewiesen werden. Korrelationsanalysen zeigten einen Zusammenhang zwischen den genannten Parametern. Der Ligningehalt in der Silage und die gemessene Methanausbeute verhielten sich umgekehrt proportional (Abschnitt 4.9.2.8). Weiterhin zeigte sich eine Tendenz dahingehend, dass ein Ligninabbau, vor allem $\geq 5\%$, die Methanausbeute negativ beeinflusste.

Es wurden Mindererträge bei den Mais- und Roggensilagen nachgewiesen, welche während der Silierung enzymatisch vorbehandelt waren, sowohl bei Proben mit einer Häcksellänge von 4 mm als auch 8 mm. Vereinzelt konnte bei den direkt im Biogasprozess behandelten Mais- und Roggensilagen mit einer Häcksellänge von 4 mm eine negative Wirkung durch die zugesetzten Enzympräparate gemessen werden. Die Roggensilage, welche direkt vor dem Biogasprozess behandelt wurde, zeigte keine Abnahme der Methanausbeute durch unterschiedliche Vorbehandlungen. Das Risiko einer Abnahme des Methanertrages scheint daher in Bezug auf die Häufigkeit und Höhe der negativen Wirkungen von Enzymen und unter den verwendeten Versuchsbedingungen bei der Vorbehandlung während der Silierung am höchsten.

Einfluss der Methodik der Enzymierung auf die Biogasqualität

Die Biogasqualität, d. h. die Menge an Methan im Biogas, wurde durch die enzymatische Behandlung der Silagen, die direkt vor dem Biogasprozess oder während des Biogasprozesses erfolgte, nur geringfügig beeinflusst. Die Differenzen lagen bei bis zu 4 Vol.-%. Ellenrieder *et al.* [2010] konnten, dem gleichend, keine nennenswerte Veränderung der Biogaszusammensetzung beim Einsatz von direkt vor dem Biogasprozess enzymatisch vorbehandelter Maissilage in semikontinuierlichen, mesophilen Fermentationen nachweisen. Beim direkten Einsatz einer Enzymmischung zur Maissilage in mesophilen Batch-Tests oder kontinuierlichen Gärversuchen wiesen auch Weiß & Brückner [2008] nur eine geringe Zunahme von 1 % an Methan im Biogas nach.

Am stärksten wurden die Methangehalte durch eine enzymatische Behandlung während der Silierung beeinflusst. Der Methangehalt konnte, alle Varianten betrachtend, um bis zu 18 Vol.-% gesteigert werden. Die Zugabe von Enzymen während der Silierung wirkte sich vor allem bei den 8 mm-Häckseln positiv auf die Biogasqualität aus. In wenigen Fällen konnte auch eine Minderung des Methangehaltes gemessen werden. Diese lag maximal bei 5 Vol.-%. Dem gleichend, wurde in der Arbeit von Vervaeren *et al.* [2010] eine Abnahme des Methans im

Biogas von rund 3 Vol.-% durch den Zusatz einer Mischung aus verschiedenen Enzymen und Milchsäurebakterien während der Silierung von Mais aufgeführt.

Der Einsatz der Enzymmischung aus Cellulase und Laccase führte unabhängig von der Vorbehandlungsmethode zu einer Minderung des Methangehaltes. Der Einsatz einer Laccase zeigt keine oder eine negative Wirkung bezüglich des Methangehaltes im Biogas. Wirksam zeigte sich in vielen Fällen das pektinolytische Präparat B4 oder B1 in Kombination mit Cellulase oder Laccase.

Enzymmischungen führten in mehreren Fällen zu einer deutlichen Wirkung bezüglich der Biogasausbeute und -zusammensetzung. Bei der Maissilage von 2005 (4 mm) mit einer Dotierung von Cellulase und Pektinase vor der Silierung war die geringste Biogasausbeute, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, mit der stärksten Zunahme an Methan im Biogas verbunden. Betrachtet wurden dabei die vorbehandelten Proben mit einer Häcksellänge von 4 mm. Gleiches konnte bei der Roggensilage von 2006 (4 mm) ermittelt werden, welche direkt im Biogasprozess mit Cellulase und Pektinase enzymatisch vorbehandelt wurde. Aus der Sicht der Praxis, d. h. bezogen auf Erfahrungen mit kontinuierlichen Biogasanlagen, kann eine Minderung der Biogasausbeute mit parallel steigendem Methangehalt Anzeichen für eine Hemmung der Hydrolyse und/oder Acidogenese sein [A. Lemmer, persönliche Mitteilung, 11.11.2010]. Aus mikrobiologischer Sicht sind folgende Ursachen für eine Biogasertragsabnahme und gleichzeitige Biogasqualitätssteigerung denkbar [M. Klocke, persönliche Mitteilung, 10.11.2010]:

- Die Abbauprodukte des bakteriellen Stoffwechsels in den mit Enzym versetzten Proben können effektiver von den Methanbildnern metabolisiert werden.
- Es werden Übergangszustände gemessen, d. h. während der bakterielle Stoffwechsel gehemmt ist, läuft die Methansynthese weiter, da dies die letzte Stufe der Biogasbildung darstellt.
- Es tritt eine Hemmung von Säureverwertern bzw. Wasserstoff verwertenden Mikroorganismen ein, d. h. zur Methanogenese konkurrierende Prozesse werden gehemmt.

Der umgekehrte Fall wurde bei der Maissilage von 2006 mit einer Häcksellänge von 8 mm und einer Dotierung von Cellulase und Laccase vor der Silierung gemessen. Es wurde der höchste Biogasertrag, aber der geringste Methangehalt ermittelt. Das gilt weiterhin für die mit einem Pasteurisieren und Wasserzusatz direkt vor dem Biogasprozess behandelten Roggensilage von 2006 (8 mm). Auch die während des Biogasprozesses mit Cellulase und Laccase oder Cellulase und Pektinase vorbehandelten Maissilagen von 2006 mit einer Häcksellänge von 4 bzw. 8 mm

zeigten die genannte Wirkung innerhalb der genannten Probengruppe. Zur Erklärung der Wirkung gelten die oben genannten Gründe sowie folgende physikalische Ursachen:

- Die im Substrat gelösten Mengen an Kohlendioxid sind abhängig vom Kohlendioxid-Partialdruck während des Versuchsstarts, dem pH-Wert sowie einer Vielzahl an weiteren Faktoren. Dementsprechend können unterschiedlich hohe Kohlendioxidmengen im Substrat gelöst oder daraus freigesetzt werden.
- Auch die Verwendung von Impfschlämmen mit unterschiedlichem Ausfäulungsgrad, unterschiedlicher Restsäurebelastung oder verschiedenen Ammoniumkonzentrationen kann ein differenziertes Freisetzen von Kohlendioxid bedingen und folglich den Methananteil beeinflussen.

Aus biochemischer Sicht ist nachvollziehbar, dass die in den Silagen enthaltenen Intermediate bei der Biomethanisierung unterschiedliche Methananteile bei der Reaktion zu Methan und Kohlendioxid bedingen können. Herrmann [2010] belegte durch theoretische Berechnungen, dass beispielsweise Buttersäure eine höhere Methanausbeute als 1,2-Propandiol liefert, aber der Methangehalt des 1,2-Propandiol über dem der Buttersäure liegt. Es ist wahrscheinlich, dass Silierprodukte wie Ethanol die Hydrolysereaktion im Biogasprozess hemmen können, sich aber höhere Methangehalte einstellen, da trotz gehemmten bakteriellen Stoffwechsels die Methanproduktion weiterläuft. Gestützt wird die These dadurch, dass Ooshima *et al.* [1985] ermittelten, dass Ethanol die Adsorption von Exoglucanase an der Cellulaseoberfläche herabsetzen kann, wodurch die synergistische Wirkung von Exo- und Endoglucanase inhibiert wird. Das würde im Biogasprozess zur Hemmung der hydrolytischen Vorgänge führen. Zudem bedingt Ethanol bei der Biogasbildung im Vergleich mit Milch- und Essigsäure sowie Buttersäure und 1,2-Propandiol einen höheren theoretischen Methangehalt. [Herrmann, 2010] Dadurch würde während der nicht gehemmten Methansynthese der Methananteil bei erhöhtem Ethanolgehalt in der Probe steigen. Dies trifft beispielsweise auf die während der Silierung mit Pektinase oder Cellulase und Pektinase behandelte Maissilage von 2005 mit einer Häcksellänge von 4 mm zu. Gegenüber der unbehandelten oder mit Cellulase behandelten Maissilage wiesen die genannten Proben die geringsten Biogasausbeuten, aber die höchsten Methangehalte sowie Alkoholgehalte auf. Die Alkoholgehalte lagen um ein Vielfaches höher. Theoretisch kann der gleiche Effekt durch phenolische Komponenten, z. B. Ligninabbauprodukte, auftreten. Hernandez & Edyvean [2008] konnten anhand von stöchiometrischen Betrachtungen darstellen, dass unterschiedliche phenolische Verbindungen wie Phenol, Brenzcatechin oder Kaffeesäure, welche anaerob abbaubar und Ligninbestandteile sind, bei der Methanogenese unterschiedliche Verhältnisse von

Kohlendioxid zu Methan bilden. Dadurch wird je nach Art des Intermediats im Biogasprozess ein geringerer oder höherer Methananteil erzielt.

Es wurde bei den 8 mm langen Roggenhäckseln beobachtet, dass durch den Einsatz von Cellulase, Pektinase und Laccase oder Cellulase und Pektinase bei der Silierung von Roggen des Erntejahre 2006 bzw. 2007 sowohl die Biogasausbeute als auch der Methangehalt, verglichen mit der unbehandelten Roggensilage, in höchstem Maße stiegen. Diese Wirkung konnte nicht bei der enzymatischen Behandlung direkt vor oder während des Biogasprozesses nachgewiesen werden. Der mikrobielle Umsatz während den vier Stufen des Biogasprozesses wird demnach positiv beeinflusst.

Bei den während der Silierung enzymatisch behandelten Maissilagen von 2006 mit einer Häcksellänge von 4 mm führte der Zusatz von Pektinase und Laccase zur höchsten Minderung bezogen auf die Biogasausbeute und den Methananteil im Biogas, verglichen mit der unbehandelten Maissilage. Die Probe wies u. a. den geringsten Abbau an Lignocellulose innerhalb der hergestellten unbehandelten und enzymatisch behandelten Maissilagen von 2006 unterschiedlicher Häcksellänge auf.

4.9.2.8 Einfluss der chemischen Substratzusammensetzung auf die Methanausbeute

Die chemische Substratzusammensetzung beeinflusst in wesentlichem Maße die Biogas- bzw. Methanbildung. Daher wurden in dieser Arbeit die Zusammenhänge zwischen den erzielten Methanausbeuten (Abschnitt 4.9.2.2), bezogen auf die Frischmasse, und den Konzentrationen von ausgewählten Inhaltsstoffen⁵⁸ der hergestellten Silagen ermittelt. Die Korrelationskoeffizienten der einzelnen Silagevarianten sind dem Anhang 8.7 zu entnehmen.

Es wurden bei den Silagen, welche während der Silierung enzymatisch behandelt worden waren, die Zusammenhänge zwischen den Gehalten an Essigsäure, Milchsäure oder Gesamtsäure und der Methanausbeute untersucht. Abb. 4-36 zeigt die Zusammenhänge zwischen den ausgewählten flüchtigen Fettsäuren und der Methanausbeute der hergestellten Silagen. Tendenziell stieg die Methanausbeute mit zunehmendem Gehalt an Essig-, Milch- oder Gesamtsäure. Es waren unabhängig von Pflanzenart, Erntejahr und Häcksellänge nur sehr geringe oder geringe Korrelationen festzustellen.

Wurden die Silagen in Abhängigkeit von der Pflanzenart und dem Erntejahr geprüft, konnten für die Proben der Maissilagen von 2005 und 2006 sowie der Roggensilage von 2007 keine signifikanten Korrelationen zwischen den Gehalten an Essig- bzw. Milchsäure oder der Gesamtsäure

⁵⁸Analyseergebnisse siehe Anhang 8.2

und der Methanausbeute ermittelt werden. Im Gegensatz dazu war ein signifikanter Zusammenhang ($p < 0,001$) bei der Korrelationsanalyse zwischen den Gehalten an Essigsäure und den Methanerträgen bei den unbehandelten und vorbehandelten Roggensilagen von 2006 zu ermitteln. Demnach kann keine gesicherte Aussage zur Beeinflussung der Methanausbeute durch Gärsäuren getroffen werden, tendenziell besteht kein signifikanter Zusammenhang. Dies würde die Untersuchungsergebnisse von Herrmann [2010] mit Mais und Grünschnittroggen bestätigen. Signifikante Zusammenhänge konnten in den Versuchen von Herrmann [2010] nur zwischen den Methanausbeuten, bezogen auf die organische Trockensubstanz, und den Konzentrationen an Essigsäure sowie einwertigen Alkoholen ermittelt werden. Die Methanausbeuten, welche auf die Originalmasse bezogen wurden (ohne Berücksichtigung der Silierverluste) korrelierten nicht mit den Gärsäurekonzentrationen.

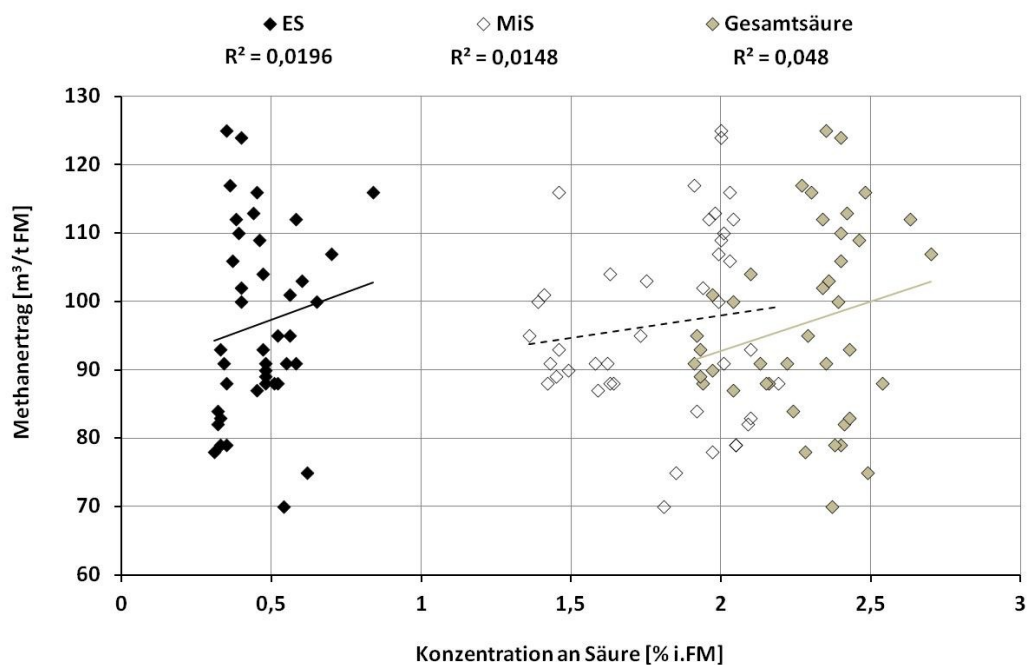


Abb. 4-36: Linearer Zusammenhang zwischen den mittleren spezifischen Methanerträgen (bezogen auf die Frischmasse) und der gemittelten Konzentration an Essigsäure (ES), Milchsäure (MiS) oder Gesamtsäure (GS = Milchsäure, Essigsäure, Propionsäure, iso-Buttersäure, n-Buttersäure, iso-Valeriansäure, n-Valeriansäure, n-Caprionsäure) der während der Silierung nicht behandelten und enzymatisch behandelten Mais- und Roggensilagen; $n = 41$

Wurde die Silage direkt vor dem Biogasprozess enzymiert, ergaben sich signifikante Zusammenhänge ($p < 0,05$) zwischen der Konzentration an Essig- oder Gesamtsäure und der Methanausbeute. Im Gegensatz zu den positiven Korrelationen bei den Silagen, welche während der Silierung enzymiert wurden, ergaben sich bei diesen Silagevarianten hinsichtlich der geprüften Säuren negative, mittelstarke bis starke Korrelationen.

Bezüglich der während der Silierung enzymatisch behandelten Silagen konnten keine eindeutigen Zusammenhänge zwischen den Gehalten an Gesamtalkohol und der Methanausbeute nachgewiesen werden. Ein signifikanter Zusammenhang ($p < 0,05$) war hingegen bei den Proben gegeben, welche direkt vor dem Biogasprozess enzymiert wurden. Allgemein betrachtet, wurden überwiegend negative Korrelationskoeffizienten ermittelt.

Im Hinblick auf die wasserlöslichen Kohlenhydrate kann nur eine Aussage für die Silageproben getroffen werden, welche direkt vor dem Biogasprozess enzymatisch behandelt wurden. Es konnte eine starke Korrelation zwischen dem Gehalt an wasserlöslichen Kohlenhydraten⁵⁹ und den Methanausbeuten (Abschnitt 4.9.2.3) gefunden werden.

Zusammenhänge ergaben sich zwischen der Methanausbeute und den Gerüstsubstanzen Cellulose, Hemicellulose und Lignin. In Abb. 4-37 sind die Zusammenhänge, bezogen auf die während der Silierung nicht behandelten und vorbehandelten Silagen, dargestellt.

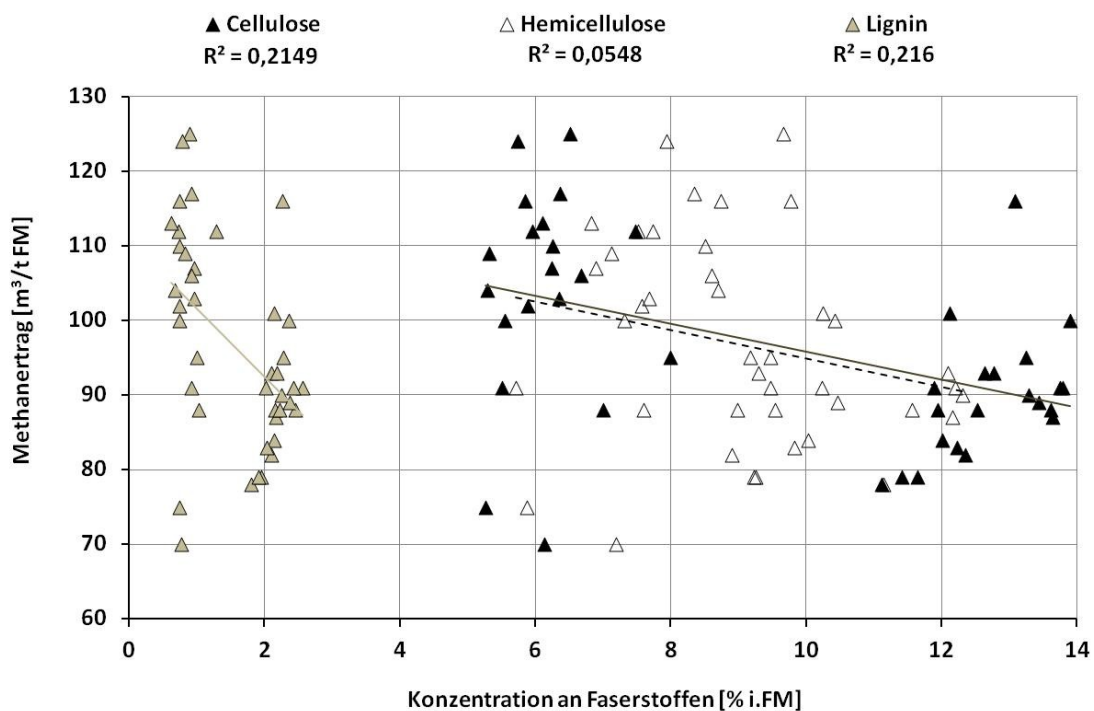


Abb. 4-37: Linearer Zusammenhang zwischen den mittleren spezifischen Methanerträgen und der gemittelten Konzentration an Cellulose, Hemicellulose und Lignin der während der Silierung nicht behandelten und enzymatisch behandelten Mais- und Roggensilagen; $n = 41$

Tendenziell nimmt die Methanausbeute zu, wenn der Gehalt an Gerüstsubstanzen abnimmt. In geringstem Maße beeinflusste die Hemicellulose die Methanausbeute. Es ergab sich kein einheitliches Bild für die geprüften Energiepflanzen. Für die Maissilagen wurden positive Korrelationen erfasst, wohingegen für die Roggensilagen negative Korrelationen ermittelt wurden.

⁵⁹Analyseergebnisse siehe Anhang 8.2

Weitaus bedeutender ist der Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Cellulose oder an Lignin und der Methanausbeute. Wurden alle in dieser Arbeit hergestellten Silagen berücksichtigt, waren signifikante Zusammenhänge ($p < 0,01$) zwischen dem Gehalt an Cellulose oder Lignin und dem Methanertrag erfassbar. Grundsätzlich scheint Lignin den Methanertrag zu dominieren. Übereinstimmend mit den während der Silierung enzymatisch behandelten Silagen, waren ebenso signifikante Zusammenhänge ($p < 0,05$) zwischen Cellulose oder Lignin und dem Methanertrag bei den Silagen zu messen, welche direkt vor dem Biogasprozess vorbehandelt wurden. Dass die Parameter Cellulose und Lignin die Methanausbeute in hohem Maße beeinflussen, wurde bereits in wenigen wissenschaftlichen Berichten aufgeführt. Kaiser [2004] schlussfolgerte, dass der Abbau der ADF-Fraktion, bestehend aus Cellulose und Lignin, die Steigerung der Methanausbeute bei der mesophilen Vergärung von Maissilage unter Enzymeinsatz bedingte. Auch Banks [2007] konnte nachweisen, dass die Methanausbeuten am stärksten mit dem Gehalt der Fraktion an Cellulose und Lignin korrelieren. Gezeigt wurde dabei die Abhängigkeit der Methanisierung von der Konzentration an Lignin, Cellulose und dem Rohfasergehalt bei 15 Pflanzen. Bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der chemischen Zusammensetzung und der Methanbildung konnte Herrmann [2010] den engsten Zusammenhang zwischen den Gehalten an ADF und der Methanausbeute bzw. der Geschwindigkeit der Methanbildung nachweisen. Anwendung fanden bei den Fermentationsversuchen Silagen aus Mais, Roggen, Sudangras und Triticale. Dass Lignin bzw. der Ligningehalt eine entscheidende Rolle bei der enzymatischen Biomassekonversion einnimmt, findet sich auch in zahlreichen Literaturangaben zur Hydrolyse von Lignocellulose wieder. Zhu *et al.* [2008] wies nach, dass mit sinkender Ligninkonzentration der Hydrolysegrad stieg. Ein Grund dafür ist zum Beispiel, dass Lignin Enzyme wie Cellulasen durch irreversible Adsorptionen inaktivieren kann. [Mansfield, *et al.* 1999] Weiterhin zeigten Arbeiten von Mussatto *et al.* [2008] einen wesentlichen Einfluss der Matrix aus Lignin und Hemicellulose auf die enzymatische Hydrolyse von Cellulose. Mit sinkendem Gehalt an Lignin und Hemicellulose konnte die Effizienz der enzymatischen Hydrolyse von Cellulose zu Glucose gesteigert werden. Dies wird dadurch begründet, dass die enzymatische Hydrolyse von Cellulose nur mittels hochspezifischer Cellulasen durchgeführt werden kann und ferner solch heterogene Reaktion den direkten physikalischen Kontakt von Enzym und Substrat voraussetzt. Dazu muss das Enzym von der wässrigen Lösung zur Partikeloberfläche und durch physikalische Barrieren wie Lignin diffundieren, auf der Oberfläche des Substrates adsorbieren und anschließend die Hydrolyse katalysieren. Reverse Hydrolasen sind allerdings nicht auszuschließen. Daher ist es unter den gegebenen Voraussetzungen wahrscheinlich, dass

hydrolytische Vorgänge im Biogasprozess intensiver ablaufen, umso geringer der Ligninanteil in den Gärmedien ist.

4.9.2.9 Einfluss der Silierung auf die Methanausbeute

In aktuellen Berichten wird angegeben, dass sich eine Silierung nur geringfügig auf den Methanertrag, bezogen auf die organische Trockensubstanz, auswirkt. Mukengele & Oechsner [2007] wiesen nach, dass sich die spezifischen Methanerträge von Mais durch einen Silierprozess geringfügig erhöhten. Herrmann [2010] fasste zusammen, dass die Methanausbeute stieg, sich aber aufgrund der Silierverluste keine signifikanten Änderungen ergaben. Mit Bezug auf die Pflanzenart, die Häcksellänge oder den Erntezeitpunkt der Silagen waren in dieser Arbeit keine einheitlichen Trends für Änderungen in den Methanerträgen durch einen Silierprozess festzustellen. Die gemessenen Veränderungen der Methanausbeuten durch eine Silierung des Erntegutes wurden bereits in Abschnitt 4.9.2.2 widergegeben.

Durch Gärungsabläufe während der Silierung werden beispielsweise pflanzeigene Kohlenhydrate durch Milchsäurebakterien verstoffwechselt, wodurch Gärprodukte wie Milchsäure oder Essigsäure entstehen. Die vier in dieser Arbeit hergestellten Silagen unterschiedlicher Erntejahre wiesen ein bestimmtes Verhältnis von Milchsäure zu Essigsäure⁶⁰ auf. Ein Verhältnis von 3:1 war bei der unbehandelten und enzymatisch behandelten Maissilage von 2005 und der Roggensilage von 2006 gegeben. Unter den genannten Silagen waren die Proben, welche die höchsten Methanertragssteigerungen durch eine enzymatische Behandlung sowie die engsten Zusammenhänge zwischen dem Essigsäuregehalt und der Methanausbeute, bezogen auf die Frischmasse, aufwiesen. Die Varianten der Maissilage von 2006 bzw. die Roggensilage von 2007 zeigten ein Verhältnis von Milchsäure zu Essigsäure von 5:1 bzw. 6:1. Hinsichtlich dieser Silagen blieb die Vorbehandlung mit Enzympräparaten wirkungslos oder ergab geringe Ertragssteigerungen.

Ziel einer Silierung ist der Erhalt des Energiewertes eines Rohstoffes. [Thaysen, 2007] Ein wesentlicher Faktor, welcher den Energiewert beeinflusst, ist der Gärverlust während einer Silierung. [Pakarinen, *et al.* 2008] Verluste führen zu einer Minderung des Methanbildungspotenzials von Energiepflanzen und sind daher bestmöglichst zu vermeiden. [Herrmann, 2009a] In dieser Arbeit wurden daher u. a. der Einfluss einer enzymatischen Vorbehandlung der Energiepflanzen auf die Gärverluste während der Silierung sowie der Einfluss der Gärverluste unbehandelter und vorbehandelter Proben auf die Methanausbeute untersucht.

⁶⁰Analyseergebnisse siehe Anhang 8.2

Am Beispiel der Ergebnisse von den Varianten der Maissilage von 2005 sollen die möglichen Effekte auf die Methanausbeuten (Abschnitt 4.9.2.2) verdeutlicht werden, welche durch Massenverluste⁶¹ während der Silierung auftreten können. Wurde fein (4 mm) gehäckselter Mais mit einem Zusatz an Pektinase einsiliert, stieg der Massenverlust auf das Zweifache, verglichen mit dem Mais ohne Enzymzusatz. Die Methanausbeute minderte sich unter Einbezug des Massenverlustes derart, dass sich eine signifikante Differenz zur Kontrollvariante ergab. Unter Einsatz der Mischung aus Cellulase und Pektinase bei den feinen Maishäckseln (4 mm) lag die Methanausbeute ohne Berücksichtigung des Massenverlustes mit 6 % über der Ausbeute der Kontrollvariante. War der Massenverlust Bestandteil der Berechnung des Methanertrages, nahm die Methanausbeute ab und lag folglich mit 15 % unter dem Ertrag der Kontrollvariante. Als dritter Effekt wurde festgestellt, dass sich die Methanertragssteigerungen von einem statistisch signifikanten Niveau durch die Einberechnung der Massenverluste auf ein nicht signifikantes Niveau verringern konnten. Bei der Applikation von Pektinase oder der Mischung aus Cellulase und Pektinase auf die Maishäcksel mit einer Länge von 8 mm nahmen die Methanertragssteigerungen bei der Vergärung der enzymatisch behandelten Proben von signifikanten 34 bzw. 36 % ($p < 0,05$) auf nicht signifikante 18 bzw. 13 % ab. Anhand der genannten Ergebnisse wird erkennbar, dass es von wesentlicher Bedeutung ist, die Massenverluste während der Silierung in die Gesamtbetrachtung einzubeziehen.

Konträr zu den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen konnten Pakarinen *et al.* [2008] eine positive Wirkung auf den Gärverlust und die Methanausbeute von Gras durch den Einsatz des Additivs „Josilac“⁶² bei einer zweimonatigen Silierung nachweisen. Bei zusätzlichem Anwelken des Grases für 24 oder 48 h vor der Silierung wurden wie in den eigenen Arbeiten festgestellt, dass das Additiv den Gärverlust steigern kann und folglich die Methanausbeute, bezogen auf die Frischmasse, im Vergleich mit der nicht behandelten Variante abnimmt.

In zwei Fällen kam es nicht zur Änderung der Methanausbeute durch den Einbezug der Massenverluste während der Silierung. Im ersten Fall handelt es sich um Roggensilage von 2006 (8 mm) mit einem Laccasezusatz, im zweiten um die Roggensilage von 2007 (8 mm), welche mit Pektinase und Laccase (0,07 g/kg Roggen) versetzt wurde.

Bei der Roggensilage von 2007 zeigte sich, dass sich die Methanausbeute durch eine Steigerung der Enzymkonzentration stärker beim Einbezug der Massenverluste minderte. Die größten

⁶¹Ergebnisse siehe Anhang 8.3

⁶²Josilac® - Cellulase, Pektinase, Xylanase + *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactiti*

Unterschiede in den Methanerträgen wurden bei den Varianten der Maissilage von 2005 gemessen, welcher sehr hohe Konzentrationen an Enzym zugesetzt wurden.

Der Mais von 2005 wurde mit unterschiedlichen Häcksellängen und Zusätzen einsiliert. Nach der Silierung und Methanisierung ergab sich innerhalb der Methanerträge der untersuchten Varianten ein bestimmtes Verteilungsmuster. Durch den Einbezug der Massenverluste kann es zur Änderung des Verteilungsmusters kommen. Werden die Massenverluste während der Silierung nicht einbezogen, kann dies folglich zu einem Fehltrail bezüglich der Enzymwirkung führen.

4.9.2.10 Einfluss der Häcksellänge der Rohstoffe auf die Methanausbeute

Da die anaerobe biologische Abbaubarkeit neben der Substratzusammensetzung von der Partikelgröße des Biogassubstrates abhängt [Cullis *et al.*, 2004; Gunaseelan, 1997], wurde die Wirkung unterschiedlicher Häcksellängen auf die Biogasproduktion von nicht behandelten und während der Silierung oder Biogasproduktion enzymatisch vorbehandelten Energiepflanzen untersucht.

Betrachtung der Varianten ohne enzymatische Vorbehandlung

Die Häcksellänge hatte in allen Fällen keinen signifikanten Einfluss auf die Methanausbeute der unbehandelten Varianten (Abschnitte 4.9.2.2 und 4.9.2.4). In zwei von fünf Fällen lag die Methanausbeute, bezogen auf die Originalfrischmasse, der Häcksel mit einer Länge von 8 mm über denen der Häcksel mit einer Partikelgröße von 4 mm. Lag die Methanausbeute der 4 mm langen Häcksel über denen der 8 mm langen Häcksel, beliefen sich die Steigerungen auf 7 bis 15 %. Herrmann [2010] konnte durch die Anwendung von Mais unterschiedlicher Häcksellängen eine Zunahme von 3-13 % messen. Fachberichte zeigen, dass sich die Methanausbeute tendenziell mit zunehmendem Zerkleinerungsgrad erhöht. Der genannte positive Effekt der Häcksellänge auf die Methanausbeute kann mit zunehmender Reife bzw. Lignifizierung des Pflanzmaterials steigen. [Herrmann, 2010; Mshandete *et al.*, 2006; Pérez López *et al.*, 2005] Konträr dazu wurde von Angelidaki & Ahrens [2000] dargestellt, dass in einem Partikelgrößenbereich von 5-20 mm keine nennenswerten Unterschiede durch die mechanische Aufarbeitung in der Biogasausbeute unter Anwendung von Rindergülle nachweisbar waren. Mit den Ergebnissen der eigenen Arbeit ließ sich kein einheitlicher Trend erkennen.

Bezogen auf den Biogasprozess bzw. auf einen guten Silierverlauf und hohe Methanausbeuten empfehlen sich allgemein kurze Häcksellängen. [Heiermann, 2010] Eine signifikante Steigerung der Methanausbeute scheint ab einem Zerkleinerungsgrad von 1 mm realisierbar zu sein. Zer-

kleinerungen auf ≤ 1 mm können eine Steigerung an Methan von über 20 % bewirken. Eine Partikelgrößenreduktion auf unter 1 mm ist jedoch, praxisbezogen, bis heute nicht ökonomisch. [Weiß & Brückner, 2008; Angelidaki & Ahrens, 2000; Gunaseelan, 1997; Badger *et al.*, 1979]

Betrachtung der Varianten mit enzymatischer Vorbehandlung

Wurden Mais oder Roggen mit einer Häcksellänge von 4 mm während der Silierung oder der Biogasproduktion mit Enzympräparaten versetzt, lagen die Ertragssteigerungen unter 5 %. In vielen Fällen führte der Enzymeinsatz zu Methanertragsminderungen. Demzufolge kann einerseits kein Potenzial zur Enzymwirkung gegeben sein oder andererseits eine Enzymapplikation zu einer Substrat- oder Produkthemmung führen. Durch die erhöhte mechanische Bearbeitung, verglichen mit den 8 mm Häckseln, wurden die Substratpartikel für den mikrobiellen Abbau zugänglicher. Die Verfügbarkeit von Zellsaft und Pflanzeninhaltsstoffen nimmt zu. [Adler, 1997] Bezogen auf die Cellulose, nimmt die verfügbare Oberfläche des Polymeren zu, welche eine wichtige Rolle bei der Wechselwirkung von Cellulase und Cellulose darstellt und ein essentieller Schritt für das Voranschreiten der Hydrolyse ist. Cellulasen adsorbieren stark an Cellulose, wobei das Maß der Adsorption proportional zur initialen Cellulosekonzentration ist. Bei Untersuchungen von Goel & Ramachandran [1983a] wurden 50 % der Endo- und Exoglucanase und rund 80 % der β -Glucosidase bei delignifizierter Bagasse und Reisstroh innerhalb von 15 min adsorbiert. Der mechanische Aufschluss kann zudem Enzyme zum Biomasseabbau freisetzen. [Rinck, 2009]

In den Fachliteraturen wie Brule *et al.* [2007] sowie Faulstich & Schieder [2008] konnte gleich den eigenen Arbeiten kein Mehrertrag an Methan von über 5 % durch eine mechanisch-enzymatische Vorbehandlung von Biogassubstraten erzielt werden. Im ersten Fall wurde das Substrat, Maisstroh oder Maiskolben, zur Biogaspotenzialbestimmung mit dem HBT-Verfahren auf ca. 4 mm zerkleinert. Gleich der eigenen Arbeit lag der maximal erreichbare Methanmehrertrag durch einen Enzymeinsatz bei 5 %. Im zweiten Fall wurde 1,5 mm feinzerkleinertes und enzymatisch vorbehandeltes Substrat (Maissilage) in unterschiedlichen Versuchen vergoren. Es konnte keine signifikante Änderung der Gaserträge gemessen werden. Auch Weiß & Brückner [2008] ermittelten bei der mesophilen Vergärung von Maissilage im Labormaßstab eine Methanertragssteigerung von 3 % durch die Kombination einer mechanischen und enzymatischen Vorbehandlung.

Die Untersuchungen mit Mais und Roggen zeigten den Trend, dass bei der Anwendung von Pflanzenmaterial mit einer Häcksellänge von 8 mm ein Wirkungspotenzial für Enzymadditive gegeben ist. Bei den enzymatisch behandelten Proben bzw. den Vorzugsvarianten, welche be-

züglich der Mehrerträge an Methan herausgestellt wurden (Abschnitt 4.9.2.7), kam Material mit einer Häcksellänge von 8 mm zur Anwendung. Bei einem Großteil der Vorzugsvarianten, welche sich auf die Methanausbeute beziehen, lag beim enzymatisch behandelten Material ebenfalls eine Häcksellänge von 8 mm vor.

Fazit

Für jedes Substrat ist separat zu prüfen, welche Partikelgröße zielführend ist, dabei muss zur Festlegung der Häcksellänge ein optimales Verhältnis zwischen hohen Gasausbeuten, der Verdichtbarkeit des Materiales, dem Anlagentyp und dem Dieselverbrauch sowie dem Durchsatz bei der Zerkleinerung gefunden werden. Thaysen [2010] gibt die Empfehlung, für Futtermittel eine Häcksellänge von 6-8 mm einzustellen, wobei sich für die Anwendung als Biogassubstrat eine intensivere Aufbereitung empfiehlt. Reinhold & Peyker [2007] halten 4 mm für die optimale Häcksellänge zum Erreichen einer hohen Silagequalität und folglich hoher Gaserträge. Auch die eigenen Arbeiten zeigten, dass eine Zerkleinerung von Mais oder Roggen auf 4 mm zu einer höheren Methanausbeute im Vergleich zu unbehandeltem oder enzymatisch behandeltem Pflanzenmaterial mit einer Länge von 8 mm führen kann.

In einer neuen Studie von Herrmann [2010] wurde unter Einsatz von Mais (z. B. 4 und 8 mm), Sudangras (4 und 7 mm), Grünschnittroggen (z. B. 5,5 und 9 mm), Wintertriticale (4 und 8 mm) und Winterroggen (4 und 8 mm) gezeigt, dass Häcksellängeneinstellungen am Feldhäcksler von unter 7 mm bei der Berücksichtigung des erhöhten energetischen Aufwandes zur Ernte und der Änderung der Kapazitäten der Ernteprozesskette zu einer Minderung der Netto-Energieproduktion und des ökonomischen Gewinns gegenüber praxisüblichen Längeneinstellungen führen kann. Daher wurden Häcksellängen von 7-8 mm empfohlen. Wenn demnach Häcksellängen von 4 mm aus ökonomischer Sicht derzeit bei Mais- und Roggensilage nicht empfehlenswert sind, sollte der Rohstoff auf 8 mm gehäckselt werden sowie geeignete Enzympräparate appliziert werden, wenn diese wirtschaftlich nutzbar sind.

4.9.2.11 Beurteilung des Biogasprozesses auf Basis der mikrokristallinen Cellulose

In jedem Versuch wurde als Referenzsubstanz mikrokristalline Cellulose (MCC), deren theoretische Biogas- bzw. Methanausbeute bekannt ist, mitgeführt. Anhand der Vergärung der MCC kann die biologische Aktivität des Inokulums beurteilt werden. In jedem Versuch war eine Mindestmenge an Methan zu erreichen, so dass von einer ausreichenden Aktivität der mikrobiellen Biozönose ausgegangen werden kann. Zudem kann anhand der Ergebnisse mit der Referenzsubstanz überprüft werden, inwieweit die Ergebnisse der nacheinander stattfindenden Versuche miteinander vergleichbar sind.

Nach Buswell [1936] ergibt sich bei hundertprozentigem Umsatz der MCC eine theoretische Biogasausbeute von $829 \text{ m}^3/\text{t oTS}$. Werden davon rund 10 % für den Stoffwechsel der Mikroorganismen abgezogen, ergeben sich $746 \text{ m}^3/\text{t oTS}$. In einem Versuchsansatz sollte die Referenzprobe ca. 80 % des zuvor genannten Betrages erzielen, das entspricht einem Wert von $597 \text{ m}^3/\text{t oTS}$. Bei der Methanisierung von MCC wird von einem Anteil an Methan bzw. Kohlendioxid von 50 % im Biogas ausgegangen. Daher ergibt sich für die Methanausbeute ein Mindestwert von $298 \text{ m}^3/\text{t oTS}$. [VDI 4630, 2006; Buswell, 1936]

Die MCC wies bei den durchgeführten Versuchen dieser Arbeit einen mittleren Methanertrag von $334 \text{ m}^3/\text{t oTS}$ ($n = 13$) auf. Die Standardabweichung lag bei $31 \text{ m}^3/\text{t oTS}$ und der Variationskoeffizient folglich bei 9,3 %. Der genannte Ertrag lag oberhalb des geforderten Mindestwertes für die Methanausbeute.

Bezogen auf die Methanausbeuten der MCC einzelner Gärtests sind zwei Fälle anzumerken, bei denen die Methanausbeute geringfügig unter der geforderten theoretischen Methanausbeute lag. Bei dem Gärtest zur Vergärung der Frischpflanze Roggen von 2006 wurde bei dem Einsatz des Standards eine um 6 % unter dem geforderten Mindestertrag liegende Methanausbeute von $279 \text{ m}^3/\text{t oTS}$ ermittelt. Beim darauf folgenden Versuch zur Vergärung von unvorbehandelten und enzymatisch vorbehandelten Roggensilagen (2006), lag die Methanausbeute mit einem Wert von $289 \text{ m}^3/\text{t oTS}$ mit 3 % unter dem Mindestertrag. Der Versuch wurde wiederholt und eine Methanausbeute von $364 \text{ m}^3/\text{t oTS}$ erzielt.

4.10 Versuche zur Optimierung des Biogasprozesses bei gegebenen Rohstoffen

4.10.1 Einsatz von Pilzabprodukten aus der Pilzzüchtung

Wurden Substrate mit einer Häcksellänge von 8 mm enzymatisch behandelt, zeigten oft Enzymmischungen eine deutliche Wirkung (Abschnitt 4.9.2). Daher sollte sich der Gewinnung von kostengünstigen Enzympräparaten mit einem weitreichenderen Enzymspektrum im Vergleich zu den angewendeten kommerziellen Enzympräparaten gewidmet werden. Weiterhin müssen die in dieser Arbeit aufgeführten kommerziellen Enzympräparate aufwendig mit Hilfe ausgewählter Mikroorganismen unter Einsatz von Nährstoffen und Energie produziert werden. Um das Enzymspektrum zu erweitern, die Kosten für Enzympräparate zu senken und Materialien bzw. Mikroorganismen sowie Energie einzusparen, wurde in ersten Versuchsreihen untersucht, ob Reststoffe der Speisepilzproduktion als neue Enzymquelle kommerzielle Enzympräparate substituieren können. Diese sind kostengünstig und ressourcenschonend.

Eingesetzt wurden Reststoffe des Pasaniapilzes bzw. Shiitake, *Lentinula edodes*, und des Austernseitlings, *Pleurotus ostreatus*, während der Silierung und des Biogasprozesses von Roggensilage mit einer Häcksellänge von 8 mm. Die eingesetzten Reststoffe (Pilzsubstrate) sind in Abschnitt 3.2.4 spezifiziert.

Weißfäulepilze sind eine der wenigen Organismen, die in der Lage sind, neben Cellulose und Hemicellulose auch Lignin, eines der am schwersten abbaubaren Biopolymere, zu depolymerisieren. Die Pilze setzen während des Wachstums ein weitreichendes Spektrum an Enzymen frei, was unter optimalen Bedingungen zu einem vollständigen Abbau von Holz führen kann. Als aktivstes Enzym bezüglich der in der Literatur aufgeführten Enzyme wie Cellulase und Laccase erwies sich die Xylanase in den Extrakten des Shiitake-Pilzes und des Austernseitlings [Elisashvili *et al.*, 2008].

Neueste Untersuchungen zeigen, dass Lignin über einen enzymatischen und einen nicht-enzymatischen Abbauprozess durch Weißfäulepilze zerlegt wird. Auf den enzymatischen Prozess wurde bereits in Abschnitt 2.2.2 eingegangen. Im nicht-enzymatischen Prozess steht die Fenton-Reaktion im Vordergrund, eine durch Eisensalze katalysierte Oxidation organischer Substrate mit Wasserstoffperoxid in saurem Medium, wobei der Mechanismus bis heute nicht eindeutig geklärt ist. Die genannte Reaktion führt zum Ligninabbau über die Bildung von freien Hydroxylradikalen. [Dashtban *et al.*, 2010]

Mikroskopische und biochemische Studien ergaben, dass Enzyme wie Laccasen und Cellulasen „zu groß sind“, um in die nicht abgebauten sekundären Zellwände des Holzes einzudringen. Daher muss der Abbau durch eine Oberflächen-Wechselwirkung von Zellwand und Enzym stattfinden. Die Initiierung der Verrottung in einer bestimmten Distanz von den pilzlichen Hyphen muss daher diffundierbare niedermolekulare Agenzien involvieren. In Frage kommen zur Permeation der Holzzellwand und Initiierung des Abbaus der Moleküle mobile Faktoren wie Veratrylalkohol und Oxalate, welche dem Pilz-Metabolismus entstammen. Folglich können die Pilze effektiver als andere Mikroorganismen die Holzzellwand besiedeln und abbauen. [Evans *et al.*, 1994]

Es sind sehr wenige Berichte bekannt, in denen der Einsatz von Weißfäulepilzen für den biologischen Aufschluss von Biogassubstraten beschrieben ist. Lethomäki [2004] führte eine Vorhydrolyse für 21 d bei 21 °C zur Methanertragssteigerung durch und nutzte dazu eine kommerzielle Mycelsuspension von *Pleurotus ostreatus*. Die Methanausbeute stieg um 4 %. DongYan *et al.* [2003] wiesen nach einer 30- oder 60-tägigen Vorhydrolyse von Getreidestroh mit *Pleurotus florida* und einer sich anschließenden mesophilen Vergärung eine Steigerung der

Biogasproduktivität nach. Auch der Abbau an Lignocellulose wurde positiv beeinflusst. Der Einsatz von Weißfäulepilzen bzw. von Reststoffen der Kultivierung als Additive während der Silierung oder Biogasproduktion wurde bisher nicht beschrieben.

Enzymatische Behandlung während der Silierung

Das abgeerntete und zerkleinerte Wachstumssubstrat der genannten Pilzarten wurde in einer Konzentration von 10 g/kg dem Roggen untergemischt und das so entstandene, mit Enzym behandelte Substrat, gleich den Proben mit dem Zusatz von kommerziellen Enzympräparaten für 90 d einsiliert. Tab. 4-25 zeigt die erzielten Ergebnisse, welche unter Einsatz der Pilzsubstrate ermittelt wurden. Diese werden im Vergleich mit den Ergebnissen der Versuche mit Mischungen aus kommerziellen Enzympräparaten dargestellt.

Der Roggen, welcher vor der Silierung mit dem gehäckselten Reststoff vom Shiitake versetzt wurde, wies die höchste spezifische Biogas- und Methanausbeute, bezogen auf die Frischmasse, auf, verglichen mit den unbehandelten und enzymatisch behandelten Roggensilagen von 2007. Der Methangehalt war gleich der Kontrollvariante. Unter Anwendung von abgeernteten, zerkleinerten Wachstumssubstraten des Austernseitlings konnte kein positiver Einfluss auf die spezifische Biogas- und Methanausbeute nachgewiesen werden.

Tab. 4-25: Spezifische Biogas- und Methanerträge (Mittelwerte \pm Standardabweichungen), mittlere Methan-gehalte und Differenz aus den Methanerträgen der während der Silierung unbehandelten und enzymatisch behandelten Roggensilagen des Erntejahres 2007 mit einer Häcksellänge von 8 mm

	n	Biogas [m ³ /t oTS]	Methan [m ³ /t oTS]	Methan [m ³ /t FM]	Methangehalt [Vol.-%]	Differenz [%]
Roggensilage 8 mm	2	449 \pm 19	245 \pm 12	84 \pm 4	54,7	0
Roggensilage + B4/L-1	2	412 \pm 1 ^{n.s.}	229 \pm 3 ^{n.s.}	78 \pm 1^{n.s.}	55,7	-7
Roggensilage + A3/B4-1	2	418 \pm 22 ^{n.s.}	236 \pm 12 ^{n.s.}	79 \pm 4^{n.s.}	56,4	-7
Roggensilage + A3/B4/L-1	3	428 \pm 15 ^{n.s.}	236 \pm 14 ^{n.s.}	79 \pm 5^{n.s.}	55,1	-6
Roggensilage + B4/L-2	3	440 \pm 27 ^{n.s.}	247 \pm 17 ^{n.s.}	82 \pm 6^{n.s.}	56,2	-2
Roggensilage + A3/B4-2	3	481 \pm 14 ^{n.s.}	278 \pm 8 ^{n.s.}	91 \pm 3^{n.s.}	57,9	+8
Roggensilage + A3/B4/L-2	3	462 \pm 8 ^{n.s.}	267 \pm 6 ^{n.s.}	88 \pm 2^{n.s.}	57,8	+5
Roggensilage + ST-1	2	488 \pm 5 ^{n.s.}	267 \pm 2 ^{n.s.}	93 \pm 1^{n.s.}	54,8	+10
Roggensilage + AS-1	3	444 \pm 17 ^{n.s.}	235 \pm 10 ^{n.s.}	83 \pm 4^{n.s.}	53,0	-1

A3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase, ST-1 = Shiitake (1. Charge), AS-1 = Austernseitling (1. Charge), Enzym-1 = 0,07 g Enzym/kg Roggen, Enzym-2 = 0,14 g Enzym/kg Roggen, n.s. = nicht signifikant, n = Probenanzahl (Eudiometerrohre)

Es ist anzumerken, dass die Pilzsubstrate in höherer Konzentration eingesetzt wurden als die kommerziellen Präparate. Die technischen Präparate sind im Vergleich zu den Pilzsubstraten stark aufkonzentrierte und aufgereinigte Enzymextrakte, welche demzufolge einen höheren Proteingehalt aufwiesen. Die Ergebnisse sind daher nur bedingt vergleichbar.

Analog der enzymatischen Behandlung mit kommerziellen Enzympräparaten, wurde die Quantität ausgewählter Inhaltsstoffe⁶³ der mit Pilzsubstrat versetzten Silagen, der Gärrückstände, der Inokula sowie der Pilzsubstrate ermittelt und dem folgend die Abbaugrade ausgewählter Stoffe während der Silierung sowie der Biogasproduktion bestimmt (Tab. 4-26).

Während der Silierung konnte im Vergleich zur unbehandelten Silage kein verstärkter Abbau an organischer Substanz oder Lignocellulose durch den Zusatz unterschiedlicher Pilzsubstrate zum Roggen nachgewiesen werden.

Tab. 4-26: Abbaugrad (Mittelwerte) der Trockensubstanz TS, organischen Trockensubstanz oTS, Cellulose, Hemicellulose und des Lignins von den während der Silierung nicht behandelten und mit Pilzsubstrat behandelten Roggensilagen des Erntejahres 2007 mit einer Häcksellänge von 8 mm

	Abbau [%]				
	TS	oTS	Cellulose	Hemicellulose	Lignin
Silierung					
Roggensilage 8 mm	4	5	6	0	0
Roggensilage + ST-1	3	4	0,2	0	0
Roggensilage + AS-1	3	4	4	0	0
Biogasbildung					
Roggensilage 8 mm	26	45	75	-	0
Roggensilage + ST-1	34	48	77	-	0
Roggensilage + AS-1	15	37	78	39	0

ST-1 = Shiitake (1. Charge), AS-1 = Austernseitling (1. Charge)

Nach der Silierung von rund 90 d war im Vergleich mit der Kontrollvariante ein höherer Gehalt an flüchtigen Fettsäuren sowie Alkoholen⁶⁴ messbar. Der ermittelte Massenverlust bzw. Gärverlust⁶⁵ der Roggensilage von 2007, welcher bei der Berechnung der Methanausbeute bezogen auf die Frischmasse berücksichtigt wurde, lag durch den Zusatz von Pilzsubstraten höher. Demnach wurden die Stoffwechselvorgänge während der Silierung durch die Pilzsubstrate beeinflusst.

Wurde die mit Pilzsubstrat behandelte Roggensilage von 2007 methanisiert, lagen der Abbau an Trockensubstanz, organischer Substanz sowie der Abbau an Cellulose leicht über dem der Kontrollvariante. Im Hinblick auf die Trockensubstanz kann von einem leicht erhöhten Substratumsatz durch den Zusatz des enzymhaltigen Nebenproduktes des Shiitake ausgegangen werden. Anhand der Stoffbilanzierung der Cellulose konnte nachgewiesen werden, dass nur ein minimal erhöhter Abbau von 0,6 oder 2,4 Prozentpunkten durch den Zusatz der Pilzsubstrate des Shiitake bzw. Austernseitlings möglich war.

⁶³Analyseergebnisse siehe Anhang 8.2

⁶⁴Analyseergebnisse siehe Anhang 8.2

⁶⁵Ergebnisse siehe Anhang 8.3

Enzymatische Behandlung während des Biogasprozesses

Die unbehandelte Roggensilage von 2007 wurde mit 10 g Pilzsubstrat pro Kilogramm Roggensilage versetzt und im Batch-Gärtest fermentiert. Beim Einsatz der zerkleinerten Reststoffe der Speisepilzkultivierung konnte eine geringfügige Steigerung der spezifischen Biogasausbeute aber nicht der spezifischen Methanausbeuten, bezogen auf die organische Trockensubstanz und Frischmasse, erzielt werden (Tab. 4-27). Das begründet sich durch die geringeren Methangehalte beim Einsatz von Pilzsubstraten, verglichen mit dem Wert der enzymfreien Probe.

Unter Einsatz des Shiitakeextraktes, gewonnen aus den abgeernteten, gewässerten und gepressten Wachstumssubstraten, konnte sowohl die spezifische Biogas- als auch die Methanausbeute, bezogen auf die organische Trockensubstanz und Frischmasse, erhöht werden. Der Einsatz des Austernseitlingextraktes führte wie in den Tests zuvor zu einem leicht verminderten Methanertrag. Die Methangehalte der mit Pilzsubstrat versetzten Proben lagen, wie in den Untersuchungen davor, unter dem der Kontrollvariante. Wurde das Fermentationsmedium im Gärgefäß zusätzlich gerührt, konnten die Methanausbeuten im Vergleich zu den nicht gerührten Proben geringfügig gesteigert werden. Die höchste Methanausbeute wurde bei der gerührten und mit dem Shiitakeextrakt versetzten Roggensilage (8 mm) ermittelt. Das Rühren erfolgte durch ein dem Gärgefäß zugesetztes Magnetstäbchen, angetrieben durch eine sich im Wasserbad befindliche Rührplatte.

Tab. 4-27: Spezifische Biogas- und Methanerträge (Mittelwerte \pm Standardabweichungen), mittlere Methangehalte und Differenz aus den Methanerträgen der während des Biogasprozesses unbehandelten und mit Pilzsubstrat behandelten Roggensilagen des Erntejahres 2007 mit einer Häcksellänge von 8 mm

	n	Biogas [m ³ /t oTS]	Methan [m ³ /t oTS]	Methan [m ³ /t FM]	Methangehalt [Vol.-%]	Differenz [%]
Zerkleinertes Pilzsubstrat						
Roggensilage 8 mm	2	449 \pm 19	245 \pm 12	84 \pm 4	54,7	0
Roggensilage + ST-2	3	458 \pm 8 ^{n.s.}	242 \pm 6 ^{n.s.}	83 \pm 2^{n.s.}	52,9	-1
Roggensilage + AS-2	3	468 \pm 10 ^{n.s.}	241 \pm 7 ^{n.s.}	83 \pm 2^{n.s.}	51,6	-2
Presssaft						
Roggensilage 8 mm	3	443 \pm 28	258 \pm 17	87 \pm 6	58,2	0
Roggensilage + ST-3	2	495 \pm 36 ^{n.s.}	272 \pm 4 ^{n.s.}	91 \pm 1^{n.s.}	54,9	+5
Roggensilage + ST-3/Rühren	2	483 \pm 62 ^{n.s.}	280 \pm 23 ^{n.s.}	94 \pm 8^{n.s.}	58,0	+9
Roggensilage + AS-3	2	439 \pm 86 ^{n.s.}	244 \pm 35 ^{n.s.}	82 \pm 12^{n.s.}	55,5	-5
Roggensilage + AS-3/Rühren	2	491 \pm 82 ^{n.s.}	254 \pm 50 ^{n.s.}	85 \pm 17^{n.s.}	51,7	-2

ST-2 = Shiitake (2. Charge), AS-2 = Austernseitling (2. Charge), ST-3 = Shiitake (3. Charge), AS-3 = Austernseitling (3. Charge), n.s. = nicht signifikant, n = Probenanzahl (Eudiometerrohre)

Zur Überprüfung der Eigengasbildung der Pilzsubstrate wurden diese dem Inokulum ohne Mais- oder Roggensilage zugesetzt. Die Kurven der Biogasbildung⁶⁶ der mit Pilzsubstrat versetzten Proben lagen auf oder geringfügig unter der des Inokulums. Es ergaben sich identische Methanerträge für das unbehandelte Inokulum sowie das mit dem Pilzsubstrat des Shiitake versetzten Inokulums in Höhe von 328 m³/t oTS. Die Methanausbeute von 321 m³/t oTS des mit dem Pilzsubstrat vom Austernseitling behandelten Inokulums lag geringfügig unter der des nicht behandelten Inokulums.

Wurde das zerkleinerte Pilzsubstrat des Austernseitlings während der Biogasproduktion von Roggensilage (8 mm) eingesetzt, zeigte sich ein verstärkter Abbau an Trockensubstanz, organischer Substanz und Hemicellulose (Tab. 4-28). Diese Probe wies die höchste Biogasausbeute im Vergleich mit der unbehandelten und der mit gehäckseltem Pilzsubstrat des Shiitake behandelten Roggensilage auf. Aufgrund des geringen Methangehaltes im Biogas der genannten Probe kann von einer gehemmten Methanbildung ausgegangen werden. Der Methangehalt lag deutlich unter dem der Kontrollvariante. Gründe für eine Hemmung der Methanbildung wurden bereits in Abschnitt 4.9.2.7 diskutiert. Zudem enthalten die Nebenprodukte der Speisepilzproduktion eine Vielzahl an organischen und anorganischen Verbindungen, welche ebenso einen Einfluss auf die Biogas- bzw. Methanbildung aufweisen können. Der Zusatz des Pilzsubstrates des Shiitake zeigte keine Wirkung auf den Abbau an organischer Substanz oder Cellulose.

Tab. 4-28: Abbaugrad (Mittelwerte) der Trockensubstanz TS, organischen Trockensubstanz oTS, Cellulose, Hemicellulose und des Lignins von den während des Bioasprozesses nicht behandelten und mit Pilzsubstrat behandelten Roggensilagen des Erntejahres 2007 mit einer Häcksellänge von 8 mm

	Abbau [%]				
	TS	oTS	Cellulose	Hemicellulose	Lignin
Zerkleinertes Pilzsubstrat					
Roggensilage 8 mm	26	45	75	-	0
Roggensilage + ST-2	28	41	75	44	0
Roggensilage + AS-2	66	70	71	93	0
Presssaft					
Roggensilage 8 mm	50	55	72	-	47
Roggensilage + ST-3	54	60	66	-	0
Roggensilage + ST-3/Rühren	34	46	57	-	0
Roggensilage + AS-3	48	56	69	-	0
Roggensilage + AS-3/Rühren	63	68	68	-	47

ST-2 = Shiitake (2. Charge), AS-2 = Austernseitling (2. Charge), ST-3 = Shiitake (3. Charge), AS-3 = Austernseitling (3. Charge)

⁶⁶Biogaskurven siehe Anhang 8.4

Der Celluloseabbau wurde bei der Enzymierung von Roggensilage mit zerkleinertem Material sowie dem Presssaft während dem Biogasprozess nicht erhöht. In einzelnen Fällen konnte beim Einsatz der Presssäfte der Abbaugrad an Trockensubstanz und organischer Substanz gesteigert werden. Das waren die Proben, bei denen der höchste Biogasertrag, aber die geringsten Methan-gehalte ermittelt wurden. Eine Modifizierung von Lignin scheint durch den Pilzzusatz nicht statt-zufinden. Die im Pilzsubstrat vorhandenen Lignin abbauenden Enzyme wiesen geringe Aktivi-täten auf (Daten nicht dargestellt) und wurden zudem in sehr geringer Dosis dem Prozess zuge-führt, wodurch eine Depolymerisierung, wie sie z. B. von Crestini *et al.* [1996] beschrieben wurde, nicht stattfinden konnte.

Fazit

Der Zusatz von Pilzsubstraten des Austernseitlings wirkte sich negativ auf die Methanbildung von Roggensilage mit einer Häcksellänge von 8 mm aus und führte unabhängig von der Metho-dik der enzymatischen Behandlung in allen Fällen, verglichen mit der enzymfreien Roggen-silage, zu einer geringeren Methanausbeute (bezogen auf oTS oder FM).

Wurden Nebenprodukte der Shiitake-Produktion während der Silierung oder dem Biogasprozess eingesetzt, waren Steigerungen in der Biogasproduktion möglich. Eine Zunahme der Methanaus-beute war beim Einsatz von zerkleinertem Pilzsubstrat des Shiitake während der Silierung sowie beim Einsatz des Presssaftes während dem Biogasprozess (unter Rühren) messbar. Die erzielten Ergebnisse lagen in gleicher Größenordnung. Im ersten Fall lag die Methanausbeute bezogen auf die Frischmasse bei 93 m³/t und damit 10 % über der Kontrolle und im zweiten Fall bei 94 m³/t mit einer Steigerung von 9 %.

Es ist grundsätzlich möglich, kommerzielle Enzympräparate oder Mischungen aus Enzympräpa-raten durch Enzymsubstrate aus Reststoffen der Speisepilzzucht zu substituieren. Es wurden durch den Zusatz von Pilzsubstraten des Shiitake-Pilzes Mehrerträge an Methan ermittelt, welche im Bereich der erzielten Mehrerträge von Proben mit einer Dotierung von kommerziellen Enzympräparaten lagen, sowohl beim Einsatz des Pilzsubstrates der Shiitakepilzkultivierung während der Silierung als auch beim Einsatz während des Biogasprozesses.

4.11 Wirtschaftlichkeitsbetrachtung

Für die Beurteilung der Wirtschaftlichkeit wurden die Substratkosten bezogen auf die erzeugten Kilowattsunden (elektrisch) nach Weiß & Brückner [2008] berechnet. Berücksichtigung fanden bei der Berechnung die Enzymkosten der Vorbehandlungen, aber nicht die zusätzlichen Aufwendungen für eine mechanische Aufbereitung auf 4 mm. Die Substratkosten und die Stromerzeugung lassen sich wie folgt kalkulieren:

Substratkosten [Cent/kWh_{el}] =

(Substratbereitstellungskosten [Euro/t FM] + Enzymkosten [Euro/t FM]) x 100/Stromerzeugung [kWh_{el}/t FM]

Stromerzeugung [kWh_{el}/t FM] =

Methanausbeute [m³/t FM] x Heizwert Methan [10 kWh/m³] x elektrischer Wirkungsgrad [40 %]

Im Anhang 8.8 sind die für jede Vorbehandlungsmethodik berechneten Kosten aufgeführt. Für die mit Laccase oder Enzymmischungen mit Laccase versetzten Proben wurden keine Berechnungen durchgeführt, da für Laccase, welche als Spezialenzym und nicht als technisches Enzympräparat auf dem Markt angeboten wird, ein sehr hoher Preis von ca. 20 Euro/g festgesetzt ist. Dieser Preis liegt mit dem Faktor 1000 über dem von technischen Enzymen. Das Ergebnis wäre in jedem Fall als unwirtschaftlich einzustufen.

Allgemein wurden aufgrund hoher Enzymeinsatzmengen, Enzymkosten oder einer fehlenden Wirkung der Enzympräparate bei der Enzymierung während der Silierung sowie direkt vor dem Biogasprozess keine wirtschaftlich relevanten Ergebnisse erzielt.

Wurden die kommerziellen Enzympräparate während des Biogasprozesses bei der Vergärung von Mais- oder Roggensilage mit einer Häcksellänge von 8 mm eingesetzt, konnten die Substratkosten durch das pektinolytische Enzympräparat B1, mit hemicellulolytischen und cellulolytischen Nebenaktivitäten, im Vergleich zur unbehandelten Variante gesenkt werden. Der Betrag verringerte sich bei der Mais- bzw. Roggensilage um 0,34 bzw. 0,30 Cent/kWh_{el}. Der Einsatz des genannten Enzympräparates kann demnach unter den gewählten Bedingungen die Prozesseffektivität steigern.

Die Substratkosten konnten in höherem Maße, verglichen mit dem Enzym B1, durch den Einsatz von Pilzsubstraten des Shiitakepilzes im „Rohzustand“ - zerkleinertes, abgeerntetes Wachstums-substrat - während der Silierung von Roggen gesenkt werden. Die Differenz zur nicht mit Enzym behandelten Silage betrug 0,98 Cent/kWh_{el}. Wurde Rohpresssaft eingesetzt, wobei die Kosten des Pressens nicht einberechnet wurden, war ohne sowie mit Rühren des Fermentermediums eine Minderung der Substratkosten um 0,19 bzw. 0,63 Cent/kWh_{el} möglich.

5 Weiterführende Arbeiten

Im Folgenden werden Erfolg versprechende Anschlussarbeiten skizziert:

- Laboruntersuchungen spiegeln nur bedingt die realen Zustände einer Biogasanlage wider. Folglich wird die Überführung der in dieser Arbeit ermittelten Vorzugsvarianten in einem Praxisversuch angestrebt. Empfohlen wird der Einsatz eines Enzympräparates mit pektinolytischer Hauptaktivität, Enzym B4 bzw. B1, während der Silierung oder des Biogasprozesses. Die Untersuchungen sollten neben der Energieproduktion und dem Faserabbau u. a. durch die Messung der Viskosität des Fermentermediums und der Rührwerksleistung zur Bewertung der Enzymleistung ergänzt werden.
- Hinsichtlich der Pilzsubstrate aus der Speisepilzproduktion dürfte ein Potenzial zur Herstellung eines neuartigen Enzymadditivs mit einem reichhaltigen Spektrum an Biokatalysatoren für die Optimierung des Biogasprozesses erschlossen werden. Durch die Verwertung eines Reststoffes bzw. Nebenproduktes aus der Lebensmittelindustrie kann zur Kreislaufwirtschaft, Energieeinsparung und Ressourceneffizienz beigetragen und womöglich ein kostengünstiges Präparat hergestellt werden. In weiteren Forschungsarbeiten besteht die Herausforderung darin, das Substrat aufzukonzentrieren, d. h. das enzymatische Potenzial zu erhöhen, und zu stabilisieren. Weiterhin sind umfangreiche Studien zum Verständnis der Wirkungsweise der „neuen Biokatalysatoren“ durchzuführen. Dazu wird u. a. empfohlen, das vollständige „Enzymbesteck“ zu identifizieren. In Folgeuntersuchungen können weitere Pilzarten einbezogen und enzymhaltige Extrakte unterschiedlicher Pilzarten zu einem hoch wirksamen „Enzymcocktail“ kombiniert werden. Es wird angestrebt, die Innovation der Herstellung von Enzymadditiven aus Produktionsrückständen der Speisepilzgewinnung in Form eines Gebrauchsmusters zu schützen. Die Anerkennung steht unmittelbar bevor.
- Die Analysemethoden zur Faseranalytik sind für präzisere Aussagen zum Abbauverhalten der Lignocellulose während der Biogasproduktion zu überarbeiten. Für Fermentermedien bzw. Gärrückstände liegen derzeit keine standardisierten Analysevorschriften vor.
- Auch die Ergebnisse der Vorhydrolysen zeigen Potenziale für die Optimierung von Biogasprozessen und sollten daher bezüglich der Vielfalt der Enzyme, der Substrate und der Konzentrationen der Reaktionspartner erweitert werden. Aufgrund der Heterogenität der Proben und der nicht gesicherten Ergebnisse, ist die Methodik der Probenahme und Probenaufbereitung zu überdenken. Es ist zu prüfen, ob Prozesswasser das Trinkwasser substituieren kann.

6 Zusammenfassung

Die während eines Biogasprozesses vergorenen Energiepflanzen verfügen über unterschiedlich energetisch nutzbare Substanzen. Hauptsächlich werden im Prozess Kohlenhydrate, Proteine und Lipide zu Energie in Form von Methan umgesetzt. In den Pflanzenzellwänden befindliche Polysaccharide stehen dem Prozess nur bedingt als Energiequelle zur Verfügung, da diese in einem Komplex mit Lignin verknüpft sind. Um diese Substanzen für den Biogasprozess verfügbar zu machen und demnach den Substratumsatz bzw. die Prozesseffizienz zu erhöhen, sind geeignete Stoffe oder Techniken einzusetzen bzw. zu entwickeln. In dieser Arbeit wurde zielführend der Einsatz von unterschiedlichen Enzympräparaten in drei verschiedenen Prozessstufen bei ausgewählten Energiepflanzen mit variierender Häcksellänge untersucht. Anhand von Enzymaktivitätsbestimmungen konnten Enzympräparate für die einzelnen Stufen selektiert werden. Die ausgewählten Enzyme wurden einzeln oder in Mischung während der Silierung, direkt vor dem Biogasprozess sowie während des Biogasprozesses zum Substrat dotiert und dieses nach der jeweiligen Vorbehandlung in Batch-Gärtests vergoren. Neben der Biogas- und Methanausbeute wurde zur Bewertung der Enzymleistung der Abbau an Lignocellulose sowie die Freisetzung an niedermolekularen Kohlenhydraten ermittelt. Zusätzlich wurde das Quellen der Lignocellulose mit Hilfe eines Wasserzusatzes in Form einer Vorhydrolyse als Vorbehandlungsmethode mit allgemein positivem Ergebnis geprüft.

Enzymatische Behandlung der Rohstoffe während der Silierung: Die Ergebnisse zeigen, dass die Methanausbeute, bezogen auf die organische Trockenmasse, durch einen Zusatz von Enzympräparaten vor der Silierung sowohl bei Mais als auch bei Roggen mit einer Häcksellänge von 8 mm gegenüber dem unbehandelten Material signifikant gesteigert werden kann. Unter Berücksichtigung der Silierverluste war die Differenz in der Methanausbeute nur für Roggen signifikant. Ursächlich hierfür sind durch den Enzymzusatz gestiegene Massenverluste während der Silierung. Bei Häckseln von 4 mm Länge waren keine signifikanten Ertragssteigerungen möglich. Der Einbezug von Silierverlusten führte in zwei Fällen sogar zu signifikanten Mindererträgen. Der Abbau an Cellulose beeinflusste in signifikantem Maße die Milchsäureproduktion. Die Essigsäureproduktion wurde auf signifikantem Niveau durch den Abbau an Hemicellulose sowie die Freisetzung an wasserlöslichen Kohlenhydraten gefördert. Es zeigte sich die Tendenz, dass mit sinkendem Gehalt an Faserstoffen und steigendem Säuregehalt die Methanausbeute zunimmt. Demnach ist der Abbau von Polysacchariden positiv zu bewerten.

Ein Potenzial für die Steigerung der Methanausbeute durch eine enzymatische Vorbehandlung ist nach den Ergebnissen dieser Arbeit bei Energiepflanzen gegeben, die eine theoretische Häcksel-

länge von 8 mm aufweisen. Die stärksten Effekte auf die Biogas- und Methanbildung sowie den Abbau an Cellulose durch eine Enzymierung zeigten sich bei der enzymatischen Vorbehandlung während der Silierung. Aufgrund der hohen Kosten für die Enzyme konnten ökonomische Vorteile zunächst nicht dargestellt werden. Die Substitution der kommerziellen Präparate durch enzymhaltige Nebenprodukte der Speisepilzproduktion ist ein erfolgversprechender Ansatz zur Steigerung der Wirtschaftlichkeit von Biogasprozessen.

Enzymatische Behandlung der Silage direkt vor dem Biogasprozess: Eine Vorhydrolyse mit Enzym- und/oder Wasserzusatz bewirkte eine verstärkte Kohlenhydratfreisetzung sowie eine Steigerung der Methanausbeute, bezogen auf die Frischmasse. Wird bei der Vorhydrolyse von Roggensilage (8 mm) eine Mischung aus Enzymen und Wasser appliziert, kann die Kohlenhydratfreisetzung aus Polysacchariden der Lignocellulose signifikant gesteigert werden, verbunden mit einer deutlichen Zunahme des Methanertrages. Der Abbau von Lignocellulose während der Vorhydrolyse wirkt sich positiv auf den Methanertrag aus. Mit sinkendem Gehalt an Faserstoffen steigt die Methanausbeute. Der höchste Celluloseumsatz und die höchste Methanausbeute wurden unter Anwendung von Wasser erzielt. Zur Absicherung der Ergebnisse sind weitere Untersuchungen zu empfehlen.

Enzymatische Behandlung der Silage während des Biogasprozesses: Der Enzymzusatz zeigte eine positive Wirkung bei den Mais- und Roggensilagen mit einer Häcksellänge von 8 mm hinsichtlich der Methanausbeute, bezogen auf die Frischmasse, aber keine signifikante Steigerung der Methanbildung. Aufgrund erster positiver ökonomischer Einschätzungen ist der Einsatz eines Pektinasepräparates mit hemicellulolytischen und cellulolytischen Nebenaktivitäten empfehlenswert. Die Versuche haben gezeigt, dass der Pektinabbau eine große Wirkung auf die enzymatische Abbaubarkeit der Pflanzenpolymere hat, obwohl der Pektingehalt in den Pflanzen gering ist. Bei der Mais- und Roggensilage mit einer Häcksellänge von 4 mm blieb der Enzymeinsatz wirkungslos oder führte zu Mindererträgen. Es wurde festgestellt, dass die Methanerträge der 4 mm langen unbehandelten Häcksel über denen der 8 mm langen behandelten Häcksel lagen. Demnach ist der Energieaufwand der Zerkleinerung den Enzymkosten gegenüberzustellen.

Das Ziel der verbesserten Substratumsetzung bei Mais und Roggen und folglich einer Erhöhung der Biogasproduktion wurde durch den Zusatz ausgewählter Enzympräparate erreicht. Es konnten Grundlagen bezüglich der Wirkung von Enzymen in Biogasprozessen geschaffen werden, anhand derer deutlich wurde, dass besonders die enzymatische Behandlung in den der Methanisierung vorgelagerten Prozessstufen weiterzuentwickeln ist.

Summary

Energy plants fermented during anaerobic digestion (biogas process) contain different substances which can be converted to methane and thus into a usable form of energy. The basic components are primary carbohydrates, proteins, and lipids. Polysaccharides of plant cell walls are of limited digestibility due to their cross-linking to lignin. In order to make the molecules available for the biogas process and thus increase the substrate utilization and process efficiency appropriate substances or techniques are needed. It was therefore the aim of this work to investigate the effects of different enzyme preparations in three digestion process stages. Selected energy plants with varying degrees of particle sizes (chopping lengths) were used as digester feedstock. Enzyme preparations for the different process stages were chosen by enzyme assays. The selected enzymes were added to the feedstock during the ensiling, directly before the biogas process or during the biogas process separate or in mixtures. Pre-treated substrates were subsequently digested in batch fermentation tests. Beside the biogas and methane yield the degradation degree of lignocellulose and the release of low-molecular carbohydrates were investigated for evaluating the enzyme performance. Additionally, the swelling of lignocellulose caused by addition of water in a pre-hydrolysis process was examined as a method of pre-treatment, with generally positive results.

Enzymatic treatment of raw materials during ensiling: The results show a significant increase in methane yield, based on organic matter, when maize or rye with a particle length of 8 mm was treated with enzymes before ensiling compared to untreated materials. Under consideration of losses in mass during ensiling, the differences in methane yield were only significant for rye. This is caused by increasing losses in mass during ensiling by applying enzymes. No significant increase in yield could be measured in the use of 4 mm particles. In two cases the consideration of mass losses leads to a significant decrease in yield. The degradation of cellulose affected the lactic acid production to a significant extent. On a significant level the acetic acid production was promoted by the hemicellulose degradation and release of water soluble carbohydrates respectively. The degradation of polysaccharides resulting from enzyme addition is generally positive because the trend indicated that methane yields are rising with decreasing contents of fibres and enhancing acid contents.

According to the work results a potential for an increase in methane yield by enzymatic treatment is given when energy plants with a particles size of 8 mm are used. The strongest effects regarding biogas and methane production as well as cellulose degradation by an enzymatic treatment were achieved with an enzymation during ensiling. As a result of the high costs for

enzymes no economic advantages are obtainable. The substitution of commercial preparations by enzyme-containing by-products of edible mushroom production is a promising approach for enhancing the economic efficiency of biogas processes.

Enzymatic treatment of silage directly before biogas process: A prehydrolysis with enzyme and/or water addition caused a release of carbohydrates and an enhancement in methane yield, based on fresh matter. A significant increase in the availability of carbohydrates from polysaccharides of lignocellulose, associated with a strong increase in methane yield, can be obtained by adding enzymes and water to rye silage (chopping length 8 mm). The degradation of lignocellulose during the prehydrolysis has a positive effect on methane yields. Decreasing fibre concentrations increases methane yields. The highest cellulose conversion and methane yield was achieved when water was added. For a validation of the results further investigations are needed.

Enzymatic treatment of silage during the biogas process: An enzymatic application led to a positive impact on the methane yield, based on fresh matter, when maize and rye with a particle size of 8 mm was used. However, no significant overall enhancement was measurable. Based on preliminary positive economic assessments, the application of pectinase preparations with side activities like hemicellulase and cellulase is advisable. The tests have shown that the degradation of pectin has a major impact on the enzymatic biodegradability of plant polymers even if the content of pectin is low. Reduced yields or ineffectiveness with respect to methane yields was found in tests with maize or rye silage with a chopping length of 4 mm. It has been observed that the methane yields for untreated particles with a particle size of 4 mm are higher than the yields of treated particles with a size of 8 mm. Thus the energy needed for chopping has to be considered in relation to enzyme costs.

The aim of an improved substrate conversion of maize and rye and thus an enhanced biogas production by enzymatic pretreatments was achieved. Scientific fundamentals regarding the impact of enzymes on biogas processes were established. Enzymatic pretreatments in process steps before methanation showed potential for further developments.

7 Literaturverzeichnis

1. Adesogan A. T. (2005): Improving Forage Quality and Animal Performance with Fibrolytic Enzymes. 16th Florida Ruminant Nutrition Symposium, Florida, 1.-2.2.2005
2. Adler A. (2002): Mikrobielle Kontaminationen in Silagen. Arbeitsgemeinschaft landwirtschaftlicher Versuchsanstalten, Jahrestagung, Klosterneuburg, 27.-29.5.2002
3. Adler A., Berger C., Neuhauser J., Lew H. (1997): Dynamik der epiphytischen Milchsäurebakterienflora auf Grünlandpflanzen vom Feldbestand bis zur Silage. Die Bodenkultur 48 (3), S. 165-171
4. Adney B, Baker J.(1996): Measurement of Cellulase Activities. LAP-006
5. Ahring B. K. (2003): Perspectives for anaerobic digestion. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 81, pp. 1-30
6. Amen-Chen C., Pakdel H., Roy C. (2001): Production of monomeric phenols by thermochemical conversion of biomass: a review. Bioresource Technology 79, pp. 277-299
7. Amon Th., Amon B., Kryvoruchko V., Zollitsch W., Mayer K., Gruber L. (2007a): Biogas production from maize and dairy cattle manure-Influence of biomass composition on the methane yield. Agriculture, Ecosystems and Environment 118, pp. 173-182
8. Amon T., Bodiroza V., Kryvoruchko V., Machmüller A., Bauer A. (2007b): Energetische Nutzung von Schilfgras von extensiven Naturschutzflächen des Nationalparks Neusiedler See und Makrophyten des Neusiedler Sees. Forschungsbericht, Universität für Bodenkultur Wien
9. Amon T. et al. (2006a): Optimierung der Methanerzeugung aus Energiepflanzen mit dem Methanenergiewertsystem. Berichte aus Umwelt und Forschung 80
10. Amon T., Kryvoruchko V., Hopfner-Sixt K., Amon B., Bodiroza V., Ramusch M., Hrbek R., Friedel J.K., Zollitsch W., Boxberger J. (2006b): Biogaserzeugung aus Energiepflanzen. Internationaler Workshop Biogas: „Bioenergie aus Biogasanlagen: Status und Perspektiven“, Husum, 23.3.2006
11. Amon T. (2005a): Biogaserzeugung aus Energiepflanzen: Wirkung von Enzymen auf den Biogasertrag und die Abbaugeschwindigkeit. Abstract zum Final Report, Auftraggeber: Novozymes A/S Bagsvaerd, https://forschung.boku.ac.at/fis/suchen.projekt_uebersicht?sprache_in=de&id_in=5221 (Stand 22.2.2013)
12. Amon Th., Hopfner-Sixt K., Amon B., Kryvoruchko V., Bodiroza V. (2005b): Biogaserzeugung aus Energiepflanzen: Einfluss der Sorte, des Erntezeitpunktes, der Vorbehandlung, der Konservierung und von Zusätzen auf den Methanertrag. Department für Nachhaltige Agrarsysteme, Institut für Landtechnik
13. Amon T., Kryvoruchko V., Amon B., Reinhold G., Oechsner H., Schwab M., Weiland P., Linke B. (2004): Biogaserträge von Energiepflanzen und Wirtschaftsdüngern - Laborversuchsergebnisse. KTBL-Tagung „Die Landwirtschaft als Energieerzeuger“, 30.-31.3.2004, Osnabrück, In: KTBL-Schrift 420, KTBL (Hrsg.), Darmstadt, 2. überarb. Aufl., Landwirtschaftsverlag, S. 46-61
14. Angelidaki I., Ahring B. K. (2000): Methods for increasing the biogas potential from the recalcitrant organic matter contained in manure. Water Science and Technology Vol 41, No 3, pp. 189-194
15. Anonymus: http://www.microeco.uzh.ch/uni/kurs/biochemie2002/pdf/pxxi_1_1.pdf (Stand 22.2.2013)
16. Anonymus (1999): Das PEKTIN Projekt, Universität Münster, Institut für Biochemie und Biotechnologie der Pflanzen, <http://www.uni-muenster.de/Rectorat/Forschungsberichte-1997-1998/fo18cb02.htm> (Stand 4.3.2013)
17. Anonymus (2012):

- http://www.biogasanlagen-fuettern.de/nav_bio_fuettern/biogasanlagen_richtig_fuettern/naturwissenschaftlicherhintergrund/chemischezusammensetzung/chemischezusammensetzung_1.html (Stand 21.2.2013)
18. Arab H., Helmreich B. (2008): Einfluss der Substrat-Vorbehandlung und der Prozessführung auf die Struktur, Zusammensetzung und Aktivität der Biozönose bei der Vergärung von Energiepflanzen (Mais und Gras). Schlussbericht, Technische Universität München
 19. Aro N., Pakula T., Penttilä M. (2005): Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews* 29, pp. 719-739
 20. Asp N.-G. (1987): Dietary Fibre - Definition, Chemistry and Analytical Determination. *Molec. Aspects Med.* 9, pp. 17-29
 21. Bach Knudsen K. E. (1997): Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 67, pp. 319-338
 22. Badger D. M., Bogue M. J., Stewart D. J. (1979): Biogas production from crops and organic wastes. 1. Results of batch digestions. *New Zealand Journal of Science* Vol. 22, No. 1, pp. 11-20
 23. Banks C. (2007): Renewable energy from crops and agrowastes (CROPGEN). Final report, University of Southampton
 24. Bao W., O'Malley D. M., Sederoff R. R. (1992): Wood contains a cell-wall structural protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, pp. 6604-6608
 25. Bariska M., Rotach E. P., Hunziker H. S. (2001): *Holzkunde 2 – Teil II, Holzchemie*. Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, <http://e-collection.library.ethz.ch/eserv/eth:26434/eth-26434-02.pdf> (Stand 22.2.2013)
 26. Barriere Y., Laperche A., Barrot L., Aurel G., Braind M., Jouanin L. (2005): QTL analysis of lignifications and cell wall digestibility in the Bay-O x Shahdara RIL progeny of *Arabidopsis thaliana* as a model system for forage plant. *Plant Science* 168, pp. 1235-1245
 27. Barton F. E. (1988): Chemistry of Lignocellulose: Methods of Analysis and Consequences of Structure. *Animal Feed Science and Technology* 21, pp. 279-286
 28. Bauer E.: Einführung in die Futtermittelkunde. Universität Hohenheim, <https://www.uni-hohenheim.de/fileadmin/einrichtungen/tierernaehrung/skripte/bauer/FMK-Weender-Getreide.pdf> (Stand 22.2.2013)
 29. Baumann T. (2007): Hemmstoffe und Hilfsstoffe für BioGASanlagen. 6. Rottaler Biomasse Fachgespräch: Biomasse - Kostenfaktor Nr. 1 in der Biogasanlage, Rottersdorf, 30.3.2007
 30. Bäumel M. (2006): Effizienzsteigerung durch Prozesshilfsmittel. Der Einsatz des hydrolytischen Enzyms MethaPlus zur Optimierung von Biogasanlagen. 3. Norddeutsche Biogastagung-Workshop I-Prozessbiologie, Hildesheim, 19.5.2006
 31. Beeker W. (2003): Untersuchung zur Problematik der Nacherwärmung von Maissilage, Erntejahr 2002. Diplomarbeit, Fachhochschule Südwestfalen
 32. Beer V., Suntheim L. (2003): Düngewirkung von Gülle. Schriftenreihe der Sächsischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Heft 8
 33. Beever D. E., Offer N., Gill E. M. (2000): The feeding value of grass and grass products. In: Hopkins A. (ed.) *Grass. Its production and utilization*. Blackwell Science Ltd. Oxford, UK, pp. 140-195
 34. Behrens J. (2006): Silage-Information. Sonderausgabe Mais.
 35. Belitz H.-D., Grosch W., Schieberle P. (2001): *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 5. Auflage, Springer-Verlag, ISBN 978-3-540-41096-6
 36. Bjerre A. B., Olesen A. B., Fernquist T. (1996): Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicelluloses. *Biotechnol. Bioeng.* 49, pp. 568-577

37. Bisaria V., Ghose T. K. (1981): Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. *Enzyme Microb. Technol.* 3, pp. 90-104
38. Blanchard K. C., MacDonald J. (1935): Bacterial Metabolism. I. The Reduction Of Propionaldehyde And Of Propionic Acid By *Clostridium Acetobutylicum*. <http://www.jbc.org/content/110/1/145.full.pdf> (Stand 22.2.2013)
39. Blaschek W. (1990): Cellulose, ein interessanter Grundstoff für die pharmazeutische Nutzung. *Pharmazie in unserer Zeit* 2, S. 73-81
40. Bock W., Ohm G. (1983): Einfluss der gewachsenen biologischen Struktur auf die Wasserbindungskapazität ausgewählter Obst- und Gemüsepräparate. *Die Nahrung* 27 (2), S. 205-210
41. Borzacconi L., Lapez I., Anido C. (1997): Hydrolysis constant and VFA inhibition in acidogenic phase of MSW anaerobic degradation. *Water Science and Technology* Vol. 36, Issues 6-7, pp. 479-484
42. Brulé M., Vogtherr J., Lemmer A., Oechsner H., Jungbluth T. (2011): Einfluss einer Enzymzugabe auf die Methanerträge von Gärsubstraten einer Praxis-Biogasanlage. *Landtechnik* Jg. 66, Nr. 1, S. 50-52
43. Brulé M., Oechsner H., Fischer L., Lemmer A., Jungbluth T. (2007): Einfluss der enzymatischen Substrataufbereitung auf den Biogasertrag von Energiepflanzen. *Landtechnik* Jg. 62, Nr. 6, S. 414-415
44. Bruni W., Jensen A. P., Angelidaki I. (2010): Comparative study of mechanical, hydrothermal, chemical and enzymatic treatments of digested biofibers to improve biogas production. *Bioresource Technology* 101, pp. 8713-8717
45. Bunzel M., Ralph J., Brüning P., Steinhart H. (2006): Structural identification of dihydrotriferulic and dehydrotetraferulic acids isolated from insoluble maize bran fiber. *J. Agric. Food Chem.* 54, pp. 6409-6418
46. Burana-osot J., Soonthornchareonnon N., Hosoyama S., Linhardt R. J., Toida T. (2010): Partial depolymerization of pectin by a photochemical reaction. *Carbohydrate Research* 345 (9), pp. 1205-1210
47. Buranov A. U., Mazza G. (2008): Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial Crops and Products* 28, pp. 237-259
48. Buswell, A. M. (1936): Anaerobic fermentations. *Div. State Water Survey No. 32*, p. 193
49. Calabro S., Cutrignelli M. I., Piccolo G., Bovera F., Zicarelli F., Gazaneo M. P., Infascelli F. (2005): In vitro fermentation kinetics of fresh and dried silage. *Animal Feed Science and Technology* 123-124, pp. 129-137
50. Carpita N. C., McCann M. C. (2008): Maize and sorghum: genetic resources for bioenergy grasses. *Trends in Plant Science* Vol. 13, No. 8, pp. 415-420
51. Chen Y., Cheng J. J., Creamer K. S. (2008): Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology* 99, pp. 4044-4064
52. Claassen P. A. M., Van Lier J. B., Lopez Contreras A. M., Van Niel E. W. J., Sijtsma L., Stams A. J. M., De Vries S. S., Weusthuis R. A. (1999): Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Appl Microbial Biotechnol* 52, pp. 741-755
53. Colombatto D., Mould F. L., Bhat M. K., Phipps R. H., Owen E. (2004): In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage.
 - I. Effects of ensiling temperature, enzyme source and addition level. *Animal Feed Science and Technology* Vol. 111, Nr. 1-4, pp. 111-128
 - II. Effects on rate of acidification, fibre degradation during ensiling and rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology* Vol. 111, Nr. 1-4, pp. 129-143
 - III. Comparison of enzymes derived from psychrophilic, mesophilic or thermophilic sources. *Animal Feed Science and Technology* Vol. 111, Nr. 1-4, pp. 145-159

54. Cordes A. (2006): Entwicklung eines enzymatischen Verfahrens zur Verbesserung von Ausbeute und Qualität bei der Biogasferzeugung aus pflanzlicher und tierischer Biomasse – Laborarbeiten. Abschlussbericht
55. Cosgrove D. J. (2005): Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 6, pp. 850-861
56. Crestini C., Bernini R., Porri A., Giovannozzi-Sermanni G. (1996): Biodegradation of Monomeric, Dimeric and Polymeric Lignin Models by *Lentinula edodes*. *Holzforschung* Vol. 50, No. 3, pp. 193-200
57. Cullis I. F., Saddler J. N., Mansfield S. D. (2004): Effect of Initial Moisture Content and Chip Size on the Bioconversion Efficiency of Softwood Lignocellulosics. *Biotechnology and Bioengineering* Vol. 85, No. 4, pp. 413-421
58. Dashtban M., Schraft H., Syed T. A., Qin W. (2010): Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 1 (1), pp. 36-50
59. Davin L. B., Wang H. B., Crowell A. L., Bedgar D. L., Martin D. M., Sarkanen S., Lewis N. G. (1997): Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center. *Science* 275, pp. 362-366
60. De Kruif A., Mansfeld R., Hoedemaker M. (2007): Tierärztliche Bestandsbetreuung beim Milchrind. Enke Verlag, 2. Auflage, ISBN 978-3-8304-1046-1
61. Dean D. B., Adesogan A. T., Krueger N., Littell R. C. (2005): Effect of Fibrolytic Enzymes on the Fermentation Characteristics, Aerobic Stability, and Digestibility of Bermudagrass Silage. *American Dairy Science* 88, pp. 994-1003
62. Diehl F. (2005): Microbiological Pathways.
http://www.uni-ulm.de/fileadmin/website_uni_ulm/nawi.fsbio/Vorlesungsskripte/Molekulare_Biologie/MicrobiologicalPathways.pdf (Stand 22.2.2013)
63. DIN EN 12176:1998-06 - Deutsches Institut für Normierung e.V.: Characterization of sludge - Determination of pH-value; German version EN 12176:1998
64. DLG (2006) - Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft e.V. - Ausschuss für Futterkonservierung: DLG-Schlüssel zur Beurteilung der Gärqualität von Grünfuttersilagen auf der Basis der chemischen Untersuchung. DLG-Information 2
65. Dobberstein D. (2009): Charakterisierung der Zellwandstrukturkomponenten von Maisrestpflanzen als mögliche Einflussfaktoren der ruminalen Zellwandabbaubarkeit. Dissertation, Universität Hamburg
66. Donaldson L. A. (1991): Seasonal changes in lignin distribution during tracheid development in *Pinus radiata*. *D. Don. Wood. Sci. Technol.* 25, pp. 15-24
67. Donaldson L. A. (2001): Lignification and lignin topochemistry – an ultrastructural view. *Phytochemistry* 57, pp. 859-873
68. DongYan Y., XiuJin L., ZhiJian G., YongWu W. (2003): Improving biogas production of corn stalk through chemical and biological pretreatment: a preliminary comparison study. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering* Vol. 19, No. 5, pp. 209-213
69. Durrant L. R. (1996): Biodegradation of Lignocellulosic Materials by Soil Fungi Isolated under Anaerobic Conditions. *Int. Biodet. & Biodegr.* 37 (3-4), pp. 189-195
70. Durst L. (2008): Gesundes und schmackhaftes Gärfutter für Milchvieh und Biogasanlagen. ALF Bayreuth, 3.12.2008
71. Ebringerova A., Heinze T. (2000): Xylan and Xylan derivatives - biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromol. Rapid Commun.* 21, pp. 542-556
72. Ebringerova A., Hromadkova Z., Heinze T. (2005): Hemicellulose. In: *Advances in Polymer Science* 186. Polysaccharides I: Structure, Characterization and Use. Springer-Verlag, S. 1-67, ISBN 9783540261124

73. El-Gammal A. A., Kamel Z., Adeeb Z., Helmy S. M. (1998): Biodegradation of lignocellulosic substances and production of sugars and lignin degradation intermediates by four selected microbial strains. *Polymer Degradation and Stability* 61, pp. 535-542
74. El Seoud O. A., Fidale L. C., Ruiz N., D'Almeida M. L. O., Frollini E. (2008): Cellulose swelling by protic solvents: which properties of the biopolymer and the solvent matter? *Cellulose* 15, pp. 371-392
75. Elisashvili V., Penninckx M., Kachlishvili E., Tsiklauri N., Metreveli E., Kharziani T., Kvesitadze G. (2008): *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Bioresource Technology* 99, pp. 457-462
76. Ellenrieder J., Schieder D., Mayer W., Faulstich M. (2010): Combined mechanical enzymatic pretreatment for an improved substrate conversion when fermenting biogenic resources. *Eng. Life Sci. Vol. 10, No. 6*, pp. 544-551
77. Escher B. I., Snozzi M., Schwarzenbach R. P. (1996): Uptake, Speciation, and Uncoupling Activity of Substituted Phenols in Energy Transducing Membranes. *Environ. Sci. Technol.* 30, pp. 3071-3079
78. Evans C. S., Dutton M. V., Guillen F., Veness R. G. (1994): Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. *FEMS Microbiology Reviews* 13, pp. 235-240
79. Fan L. T., Gharpuray M. M., Lee Y.-H. (1987): *Cellulose Hydrolysis Biotechnology Monographs*. Springer-Verlag, ISBN 3-540-17671-3
80. Faulon J.-L., Carlson G. A., Hatcher P. G. (1994): A three-dimensional model for lignocelluloses from gymnospermous wood. *Org. Geochem. Vol. 21, No. 12*, pp. 1169-1179
81. Faulstich M., Schieder D. (2008): Reduzierung des Anfalls an klimarelevanten Treibhausgasen durch eine optimierte Energieausbeute und –nutzung bei der Biogasgewinnung aus lignocellulosehaltigen Rohstoffen (Projektphase 1). Abschlussbericht, Technische Universität München
82. Fedorak P. M., Hruday S. E. (1984): The effects of phenol and some alkyl phenolics on batch anaerobic methanogenesis. *Water Research* 18, pp. 361-367
83. Feng Y., Qi X., Jian H.-l., Sun R.-c., Jiang J.-x. (2012): Effect of inhibitors on enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification fermentation for lactic acid production from steam explosion pretreated Lespedeza stalks. *BioResource* 7 (3), pp. 3755-3766
84. Fernandes T. V., Klaasse Bos G. J., Zeeman G., Sanders J. P. M., van Lier J. B. (2009): Effects of thermo-chemical pre-treatment on anaerobic biodegradability and hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 100, pp. 2575-2579
85. Filho E. X. F., Touhy M. G., Pulls J., Coughlan M. P. (1991): The xylan-degrading enzyme systems of *Penicillium capsulatum* and *Talaromyces emersonii*. *Biochem Soc Trans* 19, p. 25
86. Filya I. (2004): Nutritive value and aerobic stability of whole crop maize silage harvested at four stages of maturity. *Animal Feed Science and Technology* 116, pp. 141-150
87. Fischer R. (2002): Bioabbaubarkeit ausgewählter Kosmetikarohstoffe unter anaeroben Bedingungen. Diplomarbeit, Fachhochschule Weihenstephan
88. FNR - Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (2010): Leitfaden Biogas. Von der Gewinnung zur Nutzung, 5. Auflage, Gülzow, ISBN 3-00-014333-5
89. FNR - Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (2008): Biogas-eine Einführung. 5. Auflage, Gülzow
90. FNR - Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (2006): Handreichung. Biogasgewinnung und –nutzung. 3. Auflage, Gülzow

91. Fondevila M., BarriosUrdaneta A., Balcells J., Castrillo C. (2002): Gas production from straw incubated in vitro with different levels of purified carbohydrates. *Animal Feed Science and Technology* 101, pp. 1-15
92. Fraeye I., Roeck A. D., Duvetter T., Verlent I., Hendrickx M., Loey A. V. (2007): Influence of pectin properties and processing conditions on the thermal pectin degradation. *Food Chemistry* 105, pp. 555-563
93. Galler J. (2011): Silagebereitung von A bis Z, Grundlagen - Siliersysteme - Kenngrößen. Landwirtschaftskammer Salzburg (Hrsg.), 1. Auflage, Gutenberg Linz
94. Gayk I. (2006): Enzyme in organischen Lösungsmitteln. Präsentation, Universität Potsdam
95. Gerhardt M. (2007): The use of hydrolytic enzymes in agricultural biogas production. International Conference "Progress in Biogas - Biogas production from agricultural biomass and organic residues, Universität Hohenheim, Stuttgart, 18.-21.9.2007, In: Proceedings of the International Conference, Part 1, Presentations, Fördergesellschaft nachhaltige Biogas- und Bioenergienutzung (FnBB) e.V. (Hrsg.), pp. 247-254
96. Ghose T. K. (1987): Measurements of cellulase activities. *IUPAC, Pure & Appl. Chem.* 59 (2), pp. 257-268
97. Goel H. C., Ramachandran K. B. (1983a): Studies on adsorption of cellulose of lignocellulosics. *J. Ferment. Technol.* 3, pp. 281-286
98. Goel H. C., Ramachandran K. B. (1983b): Comparison of the rates of enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw and bagasse with celluloses. *Enzyme Microb. Technol.* 5, pp. 281-284
99. Gong C. S., Ladisch M. R., Tsao G. T. (1977): Cellobiase from *Trichoderma viride*: purification, properties, kinetics and mechanism. *Biotechnology and Bioengineering* Vol. 19, No. 7, pp. 959-981
100. Grabber J. H., Ralph J., Hatfield R. D., Quideau S. (1997): p-Hydroxyphenyl, Guaiacyl, and Syringyl Lignins Have Similar Inhibitory Effects on Wall Degradability. *J. Agric. Food Chem.* 45, pp. 2530-2532
101. Grand C., Ranjeva R., Boudet A. M., Alibert G. (1979): Photoregulation of the incorporation of guaiacyl units into lignins. *Planta* 146, pp. 281-286
102. Gries C. (2008): Einfluss verschiedener Silierfehler auf die Silagequalität auf Qualitätsmerkmale von Silagen aus Herbstaufwüchsen. Bachelorarbeit, Justus-Liebig-Universität Giessen
103. Gronauer A., Kaiser F. (2007): Evaluierung der Methanproduktivität nachwachsender Rohstoffe in Biogasanlagen als Grundlage für ein EDV-gestütztes Expertensystem für Beratung und Praxis. Abschlussbericht, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft
104. Grous W. R., Converse A. O., Grethlein H. E. (1986): Effect of steam explosion pretreatment on pore size and enzymatic hydrolysis of poplar. *Enzyme Microb. Technol.* 8, pp. 274-280
105. Gruber E. (2007): Grundlagen der Zellstofftechnologie. Skript „Papiertechnik“
106. Gruber L., Dobberstein D. (2007): Von der Holzfaser zur differenzierten Erfassung pflanzlicher Gerüstsubstanzen. 119. VDLUFA-Kongress, Workshop „Futtermittelanalytik für die Tierernährung“, Göttingen, 18.-21.9.2007
107. Gruber E. (2005a): Grundlagen der Zellstofftechnologie. Berufsakademie Karlsruhe
108. Gruber E. (2005b): Cellulose und Polyosen als chemische Rohstoffe. Skript „Makromolekulare Chemie Nachwachsender Rohstoffe“
109. Gruno M., Våljamäe P., Pettersson G., Johansson G. (2004): Inhibition of the *Trichoderma reesei* Cellulases by Cellobiose Is Strongly Dependent on the Nature of the Substrate. *Biotechnology and Bioengineering* Vol. 86, No. 5, pp. 503-511
110. Gunaseelan V. N. (1997): Anaerobic digestion of biomass for methane production: a review. *Biomass and Bioenergy* Vol. 13, No. 1-2, pp. 83-114

111. Günther T. (2004a): Einfluss von Cellupract AL und Myceleextrakt auf den Gasertrag der Covergärung von Gülle und Mais. Versuchsbericht (unveröffentlicht)
112. Günther T. (2004b): Testung von MethaPlus S 100 zur Steigerung des Gasertrages der Covergärung von Gülle und Mais. Versuchsbericht (unveröffentlicht)
113. Haigh P. M. (1990): Effect of herbage water-soluble carbohydrate content and weather conditions at ensilage on the fermentation of grasses silages made on commercial farms. Grass and Forage Science Vol. 45, No. 3, pp. 263-271
114. Hanaki K., Matsuo T., Nagase M. (1981): Mechanism of Inhibition Caused by Long-Chain Fatty Acids in Anaerobic Digestion Process. Biotechnology and Bioengineering Vol. XXIII, pp. 1591-1610
115. Hang Y. D., Woodams E. E. (2001): Enzymatic Production of Reducing Sugars from Corn Cobs. Lebensm.-Wiss. u. Technol. 34, pp. 140-142
116. Hang Y. D., Woodams E. E. (1999): Enzymatic Production of Soluble Sugars from Corn Husks. Lebensm.-Wiss. u. Technol. 32, pp. 208-210
117. Hasan M., Hall J. B. (1977): Dissimilatory nitrate reduction in *Clostridium tertium*. Z Allg Mikrobiol. 17 (7), pp. 501-506
118. Haslam E. (1988): Plant polyphenols (syn. vegetable tannins) and chemical defense—A reappraisal. Journal of Chemical Ecology Vol. 14, No. 10, pp. 1789-1805
119. Haßelbeck G., Stocke R.: Enzymierung: Neues Modell des Pektinmoleküls, neue Maischeenzyme. Erbslöh Geisenheim AG
120. Hatfield R. D., Ralph J., Grabber J. H. (1999): Cell wall structural foundations: Molecular basis for improving forage digestibilities. Crop Sci. 39, pp. 27-37
121. Heiermann M., Herrmann C., Idler C. (2010): Silierung von Biogaspflanzen - worauf kommt es an? Ergebnisse aus dem EVA-Projekt. Energiepflanzen für Praktiker, HVHS, SeddinerSee, 23.2.2010
122. Heiermann M., Schelle H., Plöchl M. (2002): Biogaspotenziale pflanzlicher Kosubstrate. Tagungsband „Biogas und Energielandwirtschaft – Potenzial, Nutzung, Grünes GrasTM, Ökologie und Ökonomie“, Potsdam, 18.-19.11.2002, In: Bornimer Agrartechnische Berichte Vol. 32, ATB, Potsdam-Bornim
123. Hendriks A. T. W. M., Zeeman G. (2009): Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology 100, pp. 10-18
124. Henk L. L., Linden J. C. (1992): Simultaneous ensiling and enzymatic hydrolysis of structural polysaccharides. Enzyme Microb. Technol. 14, pp. 923-930
125. Herhaus V. (2003): Biomasse - gespeicherte Energie der Sonne.
<http://www.staedte-server.de/downloads/biomasse.pdf> (Stand 18.03.2013)
126. Hernandez J. E., Edyvean R. G. J. (2008): Inhibition of biogas production and biodegradability by substituted phenolic compounds in anaerobic sludge. Journal of Hazardous Materials 160, pp. 20-28
127. Herrmann C., Heiermann M., Idler C. (2011): Effects of ensiling, silage additives and storage period on methane formation of biogas crops. Bioresource technology 102, pp. 5153-5161
128. Herrmann C. (2010): Ernte und Silierung pflanzlicher Substrate für die Biomethanisierung – Prozessgrundlagen und Bewertung. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin
129. Herrmann C., Heiermann M., Idler C. (2009a): Qualitätssilage für die Biogasproduktion. In: Gülzower Fachgespräche 32, S. 314-324
130. Herrmann C., Heiermann M., Idler C., Hertwig F. (2009b): Einfluss von Trockenmassegehalt (Abreife), Häcksellänge und Silierung auf die Biogasausbeute von Mais. In: Schwarz F. J., Meyer U.: Optimierung des Futterwertes von Mais und Maisprodukten. Sonderheft 331
131. Holtzapple M. T., Humphrey A. E., Taylor J. D. (1989): Energy requirements for the size reduction of poplar and aspen wood. Biotechnol. Bioeng. 33, pp. 207-210

132. Hopfner-Sixt K., Amon T., Bauer A., Kryvoruchko V., Amon B., Bodiroza V., Ramusch M., Hrbek R., K. Friedel J. K., Boxberger J., Zollitsch W. (2007): Möglichkeiten zur Verbesserung der Gasausbeute aus Gärrohstoffen.
133. Horbelt A., Olzem B. (2009): Biogas-Branche will eine Milliarde Euro investieren. Fachverband Biogas e.V.
134. Horbelt A., Olzem B. (2008): Fachverband Biogas sieht Aufwärtstrend für Biogasbranche. Fachverband Biogas e.V.
135. Howard R. L., Abotsi E., Jansen van Rensburg E. L., Howard S. (2003): Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. African Journal of Biotechnology Vol. 1, Nr. 12, pp. 602-619
136. Huber A.: <http://www.uni-graz.at/~huber/ahlectures> (Stand 18.03.2013)
137. Hunziker H. S. (2001): Holzkunde II - Teil 2. Holzchemie. Skript, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich
138. Izumi K., Okishio Y.-k., Nagao N., Niwa C., Yamamoto S., Toda T. (2010): Effects of particle size on anaerobic digestion of food waste. International Biodeterioration & Biodegradation 64, pp. 601-608
139. Javor T., Buchberger W., Faix O. (2003): Capillary electrophoretic determination of lignin degradation products obtained by permanganate oxidation. Analytica Chimica Acta 484, pp. 181-187
140. Jayasinghe P. A., Hettiaratchi J. P. A., Mehrotra A. K., Kumar S. (2011): Effect of enzyme additions on methane production and lignin degradation of landfilled sample of municipal solid waste. Bioresource Technology 102, pp. 4633-4637
141. Jin Z., Katsumata K. S., Lam T. B. T., Liyama K. (2006): Covalent Linkages between Cellulose and Lignin in Cell Walls of Coniferous and Nonconiferous Woods. Biopolymers 83, pp. 103-110
142. John I., Nonn H., Jeroch H., Baintner F., Joo E. (1992): Zum Einsatz von Zellulolytischen Enzymen bei der Luzernesilierung unter Besonderer Berücksichtigung der Vergärbaren Kohlenhydrate. Archiv für Tierernährung Vol. 42, Nr. 2, S. 187-195
143. Johnson E. A., Reese E. T., Demain A. L. (1982): Inhibition of *Clostridium thermocellum* Cellulase by End Products of Cellulolysis. Journal of Applied Biochemistry 4, pp. 64-71
144. Kämpfer P, Weißenfels W. D. (2001): Biologische Behandlung organischer Abfälle. Springer-Verlag, Auflage 1, ISBN: 3-540-41915-2
145. Kaiser F., Metzner T., Effenberger M., Gronauer A. (2007): Sicherung der Prozessstabilität in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. LfL-Information
146. Kaiser F., Gronauer A. (2007): Methanproduktivität nachwachsender Rohstoffe in Biogasanlagen. LfL-Information
147. Kaiser F. (2004): Untersuchung der Wirkung von MethaPlus S100 auf die Vergärung von Maissilage in Laborfermentern. Versuchsbericht der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft
148. Kalzendorf C. (2002): Wirkungen von Siliermitteln der Wirkungsrichtung 2 auf die aerobe Stabilität von Gras- und Maissilagen - Gemeinschaftsversuch der nordwestdeutschen Landwirtschaftskammern, der Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern und dem Landesamt für Verbraucherschutz und Landwirtschaft Brandenburg. Versuchsbericht, Oldenburg
149. Kamphues J., Schneider D., Leibetseder J. (1999): Supplemente zu Vorlesungen und Übungen in der Tierernährung. M. & H. Schaper Verlag, 9. Auflage, ISBN 978-3-7944-0223-6
150. Kaparaju P., Luostarinen S., Kalmari E., Kalmari J., Rintala J. (2002): Codigestion of energy crops and industrial confectionery by-products with cow manure. Batch scale and farm-scale evaluation. Wat. Sci. Technol. 45, pp. 275-280

151. Karpinnen S., Myllymäki O., Forssell P., Poutanen K. (2003): Fructan Content of Rye and Rye Products. *Cereal Chemistry* 80, pp. 168-171
152. Kaya F., Heitmann J. A., Joyce T. W. (2000): Influence of lignin and its degradation products on enzymatic hydrolysis of xylan. *Journal of Biotechnology* 80, pp. 241-247
153. Kaya F., Heitmann J. A., Joyce T. W. (1998): Effect of dissolved lignin and related compounds on the enzymatic hydrolysis of cellulose model compound. *Cellulose Chemistry and Technology* Vol. 33, No. 3-4, pp. 203-213
154. Kayembe K., Basosila L., Mpiana P. T., Sikulisimwa P. C., Mbuyu K. (2013): Inhibitory Effects of Phenolic Monomers on Methanogenesis in Anaerobic Digestion. *British Microbiology Research Journal* 3 (1), pp. 32-41
155. Kenealy W., Klungness J., Tshabalala M., Gleisner R., Horn E., Akhtar M., Zulaica-Villagomez H., Buschle-Diller G. (2003): Modification of Lignocellulosic Materials by Laccase. TAPPI Fall Technical Conference: Engineering, Pulping & PCE & I., Atlanta
156. Kim S.-K., Lee T. (2009): Degradation of lignocellulosic materials under sulfidogenic and methanogenic conditions. *Waste management* 29, pp. 224-227
157. Kim S. C., Adesogan A. T. (2006): Influence of ensiling temperature, simulated rainfall, and delayed sealing on fermentation characteristics and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science* Vol. 89, No. 8, pp. 3122-3132
158. Kim T. H., Lee Y. Y. (2006): Fractionation of corn stover by hot-water and aqueous ammonia treatment. *Bioresource Technology* 97, pp. 224-232
159. Kim H. C. (2001): α , α -Dicarbonyl-Oxime: Eigenschaften und Anwendungen in der elektrochemischen Delignifizierung. Dissertation, Philipps-Universität Marburg
160. Kirchgeßner M. (1997): Tierernährung. Leitfaden für Studium, Beratung und Praxis. DLG-Verlag, 10. Auflage, ISBN 978-3-7690-0549-3
161. Klinke H. B., Ahring B. K., Schmidt A. S., Thomson A. B. (2002): Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. *Bioresource Technology* 82, pp. 15-26
162. Klocke M. (2009): Erfassung der mikrobiellen Biozönosen in Monovergärungen von Getreide-Ganzpflanzensilage in mehrstufigen Fermentationen (bioleaching-Verfahren). Schlussbericht, Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V.
163. Kobayashi S., Ohmae M. (2006): Enzymatic Polymerization to Polysaccharides. *Adv Polym Sci* 194, pp. 159-210
164. Kordsachia O., Claus I. (2005): Entwicklung einer neuen Verfahrenskette zur Derivatisierung von Chemiezellstoff auf der Basis des Monoethanolamin-Extraktions-Verfahrens (MEA-Verfahren). Arbeitsbericht, Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft und Zentrum Holzwirtschaft der Universität Hamburg
165. König J., Grasser R., Pikor H., Vogel K. (2002): Determination of xylanase, β -glucanase, and cellulase activity. *Anal. Bioanal. Chem.* 374, pp. 80-87
166. KTBL – Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft (2005): Gasaussbeute in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. KTBL-Heft 50
167. Kuhad R. C., Singh A. (2007): Lignocellulose Biotechnology - Future Prospects. I. K. International Publishing House Pvt. Ltd., ISBN 81-88237-58-2
168. Kulkarni R. K. (1990): Mannitol Metabolism in *Lentinula edodes*, the Shiitake Mushroom. *Applied And Environmental Microbiology* Vol. 56, No. 1, pp. 250-253
169. Kumar R., Singh S., Singh O. V. (2008): Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 35 (5), pp. 377-391
170. Lachenal D., Mortha G., Sevilano R.-M., Zaroubine M. (2004): Isolation of residual lignin from softwood kraft pulp. Advantages of the acetic acid acidolysis method. *C. R. Biologies* 327, pp. 911-916

171. Langston C. W., Bouma C. (1960): A Study of the Microorganisms from Grass Silage. II. The Lactobacilli. *Applied Microbiology* 8 (4), pp. 223–234
172. Lawoko M., Henriksson G., Gellerstedt G. (2006): Characterisation of lignin-carbohydrate complexes (LCCs) of spruce wood (*Picea abies* L.) isolated with two methods. *Holzforschung* 60, pp. 156–161
173. Lebuhn M., Andrade D., Bauer C., Gronauer A. (2010): Intensivierung des anaeroben Biomasseabbaus zur Methanproduktion aus nachwachsenden Rohstoffen. Abschlussbericht, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL)
174. Lehtomäki A. (2006): Biogas Production from Energy Crops and Crop Residues. Dissertation, University of Jyväskylä
175. Lehtomäki A., Viinikainen T. A., Ronkainen O. M., Alen R. & Rintala J. A. (2004): Effect of pre-treatments on methane production potential of energy crops and crop residues. In: Guiot S. G., Pavlostathis S. G. & Lier J. B. van (eds), *Proceedings of the 10th World IWA Congress on Anaerobic Digestion*, pp. 1016–1021, IWA Publishing, London
176. Leonowicz A., Matuszewska A., Luterek J., Ziegenhagen D., Wojtas-Wasilewska M., Cho N.-S., Hofrichter M., Rogalski J. (1999): Biodegradation of Lignin by White Rot Fungi. *Fungal Genetics and Biology* 27, pp. 175–185
177. Leven L., Schnürer A. (2005): Effects of temperature on biological degradation of phenols, benzoates and phthalates under methanogenic conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation* 55, pp. 153–160
178. Limagrain-Nickerson GmbH: Biogasgewinnung. Mais als Energierohstoff.
179. Linke B., Mumme J., Mähnert P., Schönberg M., Plogsties V. (2011): Grundlagen und Verfahren der Biogasgewinnung. Leitfaden Biogas 2011, <http://www.eti-brandenburg.de> (Stand, 29.5.2013)
180. Longland A. C., Cairns A. J. (2000): Fructans and their implications in the aetiology of laminitis. Dodson & Horell Ltd., 3rd International Conference on Feeding Horses, pp. 52–55
181. Lovley D. R., Phillips E. J., Lonergan D. J., Widman P. K. (1995): Fe (III) and S⁰ Reduction by *Pelobacter carbinolicus*. *Appl Environ Microbiol.* 61 (6), pp. 2132–2138
182. Löwe C. (2004): Untersuchung von Maßnahmen zur Erhöhung der Biogasausbeute. Versuchsbericht (unveröffentlicht)
183. Lüttich K. (2008): Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Enzympräparate auf die Freisetzung reduzierender Zucker aus Substraten zur Biogasherstellung. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
184. Mackie K. L., Brownell H. H., West K. L., Saddler J. N. (1985): Effect of sulphuric dioxide and sulphuric acid on steam explosion of aspenwood. *J. Wood Chem. Technol.* 5, pp. 405–425
185. Madamwar D. B., Mithal B. M. (1986): Effect of Pectin on Anaerobic Digestion of Cattle Dung. *Biotechnology and Bioengineering* Vol. XXVIII, pp. 624–626
186. Mähnert P. (2007): Kinetik der Biogasproduktion aus nachwachsenden Rohstoffen und Gülle. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin
187. Maier J., Vetter R., Siegle V., Spliethoff H. (1998): Anbau von Energiepflanzen – Ganzpflanzengewinnung mit verschiedenen Beerntungsmethoden (ein- und mehrjährige Pflanzenarten); Schwachholzverwertung. Abschlussbericht
188. Malherbe S., Chloete T. E. (2002): Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. *Environmental Science & Bio/Technology* 1, pp. 105–114
189. Mandebvu P., West W., Froetschel M. A., Hatfield R. D., Gates R. N., Hill G. M. (1999): Effect of enzyme or microbial treatment of bermudagrass forages before ensiling on cell wall composition, end products of silage fermentation and in situ digestion kinetics. *Animal Feed Science and Technology* 77, No. 3–4, pp. 317–329

190. Mansfield S. D., Mooney C., Saddler J. N. (1999): Substrate and Enzyme Characteristics that Limit Cellulose Hydrolysis. *Biotechnol. Prog.* 15, pp. 804-816
191. Martens-Uzunova E. S., Schaap P. J. (2009): Assessment of the pectin degrading enzyme network of *Aspergillus niger* by functional genomics. *Fungal Genetics and Biology* 46, pp. 5170-5179
192. Martinez A. T., Speranza M., Ruiz-Duenas F. J., Ferreira P., Camarero S., Guillen F., Martinez M. J., Gutierrez A., del Rio J. C. (2005): Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology* 8, pp. 195-204
193. Marx S. (1995): Fructan Hydrolysis In Plants: Identification, Purification, And Characterization Of Linkage-Specific Fructan-8-Fructosidases. Dissertation, Swiss Federal Institute Of Technology Zürich
194. Mathies E., Rimbach M. (2007): Futtersäuren in der Schweinefütterung. *Nutztierpraxis Aktuell* 21, S. 56-61
195. Matthews J. F., Skopec C. E., Mason P. E., Zuccato P., Torget R. W., Sugiyama J., Himmel M. E., Brady J. W. (2006): Computer simulation studies of microcrystalline cellulose I β . *Carbohydrate Research* 341, pp. 138-152
196. Maute O., Kessler W., Leonhardt O., Kimmig M., Kessler R. W. (2001): Biomimetisch-enzymatischer Abbau von Naturstoffen – On-Line Kontrolle durch in situ Spektroskopie. 2. Deutsches BioSensor Symposium, Tübingen, 1.-3.4.2001
197. Mayer A. M., Staples R. C. (2002): Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60, pp. 551-565
198. Mayrhuber E. (2001): Homofermentative versus heterofermentative Milchsäurebakterien – Evaluierung für die Verwendung als Silagestarterkulturen. Dissertation, Universität für Bodenkultur Wien
199. Meak P. (2002): Biochemische Charakterisierung von Pflanzen unterschiedlicher Nutzungsintensität zur Ableitung von Parametern für die Ermittlung des energetischen Futterwertes. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin
200. Meeske R., Basson H. M. (1998): The effect of a lactic acid bacterial inoculant on maize silage. *Animal Feed Science Technology* 70, pp. 239-247
201. Meyer H., Kamphues J., Schneider D., Leibetseder J. (1999): Supplemente zu Vorlesungen und Übungen in der Tierernährung. Verlag M. & H. Schaper, 9. Auflage
202. Miller G. L. (1959): Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytic Chemistry* 31, pp. 426-428
203. Minor J. L. (1991): Location of lignin-bonded pectic polysaccharides. *Journal of Wood Chemistry and Technology* Vol. 11, No. 2, pp. 159-169
204. Mishra C., Leatham G. F. (1990): Recovery and Fractionation of the Extracellular Degradative Enzymes from *Lentinula edodes* Cultures Cultivated on a Solid Lignocellulosic Substrate. *Journal of Fermentation And Bioengineering* Vol. 69, No. 1, pp. 8-15
205. Mosier N., Wyman C., Dale B., Elander R., Lee Y.Y., Holtzapple M., Ladisch M. (2005): Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 96, pp. 673-686
206. Mshandete A., Björnsson L., Kivaisi A. K., Rubindamayugi M. S. T., Mattiasson B. (2006): Effect of particle size on biogas yield from sisal fibre waste. *Renewable energy* Vol. 31, No. 14, pp. 2385-2392
207. Müsel G., Schindler T., Bergfeld R., Ruel K., Jacquet G., Lapierre C., Speth V., Schopfer P. (1997): Structure and distribution of lignin in primary and secondary cell walls of maize coleoptiles analyzed by chemical and immunological probes. *Planta* 201, pp. 146-159
208. Mukengele M., Oechsner H. (2007): Einfluss der Silierung auf den spezifischen Methanertrag bei Mais. *Landtechnik* Jg. 62, Nr. 1, S. 20-21

209. Müller-Westermeier G., Lefebvre C., Nitsche H., Riecke W., Zimmermann K. (2007): Die Witterung in Deutschland 2006. Klimastatusbericht 2006
210. Müller-Westermeier G., Riecke W. (2006): Die Witterung in Deutschland 2005. Klimastatusbericht 2005
211. Mussatto S. I., Fernandes M., Milagres A. M. F., Roberto I. C. (2008): Effect of hemicelluloses and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Enzyme and Microbial Technology* 43, pp. 124-129
212. Mutschlechner O., Swoboda H., Gapes J. R. (2000): Continuous Two-Stage ABE-Fermentation using *Clostridium beijerinckii* NRRL B592 Operating with a Growth Rate in the First Stage Vessel Close to its Maximal Value. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2 (1), pp. 101-105
213. Myint M., Nirmalakhandan N., Speece R. E. (2007): Anaerobic fermentation of cattle manure: Modeling of hydrolysis and acidogenesis. *Water Research* 41, pp. 323-332
214. Neumann C. (2007): Mikrobiologie & angewandte Mikrobiologie. Gärungen. <http://home.schule.at/member/neumann/MbaM-Kolleg/MbaM-332-Gaerungen.pdf> (Stand 22.2.2013)
215. Neureiter M., Pereira dos Santos J. T., Lopez C. P., Pichler H., Kirchmayr R., Braun R. (2005): Effect of silage preparation on methane yields from whole crop maize silage. 4th Int. Symposium Anaerobic Digestion of Solid Waste, Copenhagen, 31.8.-2.9.2005
216. Neureiter M. (2004): Vor- und Nachteile von biologischen Silostarterkulturen. 10. Alpenländisches Expertenforum, BAL Gumpenstein, Irnding, 18.-19.3.2004
217. Nigatu A. S., Karlsson A., Mandere N. M. (2012): A comparative and evaluative study of potential biogas production from crops of teff (*Eragrostis tef* (Zucc) Trotter) in Ethiopia. *African Journal of Biotechnology* Vol. 11, No. 32, pp. 8103-8109
218. Nussbaum H.: Der DLG-Sinnenschlüssel für Grünfutter, Silage und Heu. http://www.landwirtschaft-mlr.baden-wuerttemberg.de/servlet/PB//show/1174623_11/LAZBW32_Sinnenschluessel_Anleitung.pdf (Stand 18.03.2013)
219. Oechsner H. (2006): Biogaspotenziale bei der Vergärung von nachwachsenden Rohstoffen. Internationaler Workshop Biogas: „Bioenergie aus Biogasanlagen: Status und Perspektiven“, Husum, 23.3.2006
220. Ölschläger V. (2001): Molekularbiologische und enzymatische Untersuchung zum Einfluss von Partikellänge und Konzentratanteil auf Parameter der fibrolytischen Pansenverdauung. Cuvillier Verlag Göttingen, 1. Auflage, ISBN: 978-3-86727-458-6
221. Ohshima M., McDonald P. (1978): A Review of the Changes in Nitrogenous Compounds of Hbage During Ensilage. *J. Sci. Fd. Agric.* 29, pp. 497-505
222. Ooshima H., Ishitani Y., Harano Y. (1985): Simultaneous Saccharification and Fermentation of Cellulose: Effect of Ethanol on Enzymatic Saccharification of Cellulose. *Biotechnology and Bioengineering* XXVII, pp. 389-397
223. Oude Elferink S. J. W. H., Kroonemann J., Gottschal J. C., Spoelstra S. F., Faber F., Driehuis F. (2001): Anaerobic Conversion of Lactic Acid to Acetic Acid and 1,2-Propandiol by *Lactobacillus buchneri*. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 67, No. 1, pp. 125-132
224. Oude Elferink S. J. W. H., Driehuis F., Gottschal J. C., Spoelstra S. F. (1999): Silage fermentation processes and their manipulation. FAO Electronic Conference on Tropical Silage, 1.9.-15.12.1999
225. Pahlow G. (1991): Role of microflora in forage conservation. In: Proceedings of the Conference on Forage Conservation towards 2000, Landbauforschung Völknerode, 23.-25.1.1991, Sonderheft 123

226. Pakarinen O., Lehtomäki A., Rissanen S., Rintala J. (2008): Storing energy crops for methane production: Effects of solids content and biological additive. *Bioresource Technology* 99, pp. 7074-7082
227. Palonen H., Viikari L. (2004): Role of oxidative enzymatic treatments on enzymatic hydrolysis of softwood. *Biotechnology and Bioengineering* Vol. 86, Issue 5, pp. 550-557
228. Patel V., Patel A., Madamwar D. (1992): Effects of Adsorbents on Anaerobic Digestion of Water Hyacinth-Cattle Dung. *Bioresource Technology* 40, pp. 179-181
229. Pérez López P. C., Kirchmayr R., Neureiter N., Braun R. (2005): Effect of physical and chemical pre-treatments on methane yield from maize silage and grains. 4th International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Waste, Copenhagen, 31.8.-2.9.2005
230. Pesta G., Lenz J. (2006): Verzuckerung von Biertrebern durch Mischenzyme zur Steigerung der spezifischen Gasausbeute bei der anaeroben Vergärung. Abschlussbericht, Technische Universität München
231. Peyker W. (2003): Standpunkt zur Silierung von Grünfütterstoffen. Bericht, Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft
232. Piber M., Köhler P. (2005): Identification of dehydro-ferulic acid-tyrosine in rye and wheat: Evidence for a covalent cross-link between arabinoxylans and proteins. *J. Agric. Food Chem.* 53, pp. 5276-5284
233. Plöchl M., Heiermann M., Linke B., Schelle H. (2001): Wieviel Strom bringen Pflanzen? *Neue Landwirtschaft* 3, S. 42-45
234. Pries M., Leurs K. (2004): Maissilagen unterschiedlicher Sorten und Häcksellängen. *Milchpraxis* 3, S. 128-130
235. Raposo F., Banks C. J., Siegert I., Heaven S., Borja R. (2006): Influence of inoculum to substrate ratio on the biochemical methane production of maize in batch tests. *Process Biochemistry* 41, pp. 1444-1450
236. Reinhold G., Peyker W. (2007): Wirkung der Silagequalität auf den ökonomischen Erfolg der Biogasanlage. 16. Tagung des Fachverbandes Biogas e.V. „Biogas im Wandel“, Leipzig, 31.1-2.2.2007
237. Reinhold, G. (2005): „Genau bilanzieren“. *Neue Landwirtschaft* 12, S. 68-72
238. Reinhold G., Jahn O. (2004): Hygienisierende Wirkungen der Biogaserzeugung auf die Gärsubstrate. 116. VDLUFA-Kongress, Rostock, 13.-17.9.2004
239. Richter W.: Siliermittel gezielt einsetzen.
<http://www.lfl.bayern.de/ite/futterkonservierung/siliermitteleinsatz.pdf> (Stand 18.03.2013)
240. Rink M. (2009): Mehr Biogas durch Ultraschall. *Energy 2.0-Kompodium* 2009, S. 132
241. Roggenforum e.V. (2005): Roggen-Rohstoff für die Biogasanlagen.
242. Romano R. T., Zhang R., Teter S., McGarvey J. A. (2009): The effect of enzyme addition on anaerobic digestion of *Jose Tall* Wheat Grass. *Bioresource Technology* 100, pp. 4564-4571
243. Rouau X., Cheynier V., Surget A., Gloux D., Barron C., Meudec E., Louis-Montero J., Citron M. (2003): A dehydrotrimer of ferulic acid from maize bran. *Phytochemistry* 63, pp. 899-903
244. Saha B. C. (2003): Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30, pp. 279-291
245. Salmen L., Burgert I. (2009): Cell wall features with regard to mechanical performance. A review. *Holzforschung* 63, pp. 121-129
246. Sanchez C. (2009): Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* 27, pp. 185-194
247. Sara M. 2004: Mikrobielle Physiologie I + II. Universität für Bodenkultur Wien
248. Schalow S. (2008): Untersuchungen zum enzymatisch-physikalischen Aufschluss von Apfeltrester. Dissertation, Technische Universität zu Berlin

249. Schaumann BioEnergy GmbH: Roggen-GPS für Biogasanlagen – die wichtigsten Kennzahlen.
http://www.schaumann-bioenergy.eu/PDF/de/biogasproduktion/silierung/Roggen_GPS.pdf
(Stand 18.03.2013)
250. Scheible W.-R., Pauly M. (2004): Glycosyltransferases and cell wall biosynthesis: novel players and insights. *Current Opinion in Plant Biology* 7, pp. 285-295
251. Scherer P., Krakat N., Neumann L., Westphal A., Satke K., Schmidt O., Scharfenberg N., Rösner C., Unbehauen M. (2009): Mikrobiologische Qualitätsanalyse von Biogasreaktoren. HAW Hamburg
252. Scherer P. (2006): Voraussetzungen für eine stabile und wirtschaftliche Prozessführung einer Biogasanlage durch Begleitanalytik und Prozessregelung. Fachtagung „Future Energy - Chancen und Perspektiven im Einsatz von Biogas, Hamburg, 2.11.2006
253. Scherer P. A., Vollmer G. R., Fakhouri T., Martensen S. (2000): Development of a methanogenic process to degrade exhaustively the organic fraction of municipal „grey waste“ under thermophilic and hyperthermophilic conditions. *Water Science & Technology* 41 (3), pp. 83-91
254. Schink B., Zeikus J. G. (1980): Microbial Methanol Formation: A Major End Product of Pectin Metabolism. *Current Microbiology* 4, pp. 387-389
255. Schläfer O., Onyeche T., Sievers M. (2007): Einfluss der Organismenvielfalt auf die Energieausbeute bei der Vergärung von Biomasse. Internationale Konferenz „Fortschritt beim Biogas“, Universität Hohenheim, 18.-21.9.2007
256. Schlegel H. G., Fuchs G. (2007): Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 8. Auflage, ISBN 978-3-13-444608-1
257. Schmidt L., Weißbach F., Wernecke K. D., Hein E. (1971): Erarbeitung von Parametern für die Vorhersage und Steuerung des Gärverlaufes bei der Grünfuttersilierung zur Sicherung einer hohen Silagequalität. Forschungsbericht, Oskar-Kellner Institut für Tierernährung
258. Schuhmann R. (2007): Untersuchungen zur Verbesserung der Hydrolyse/Versäuerung durch den Einsatz von Enzymen in Batch-Reaktoren. Masterarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin
259. Schwarz W. H. (2001): The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 56, pp. 634-649
260. Selig M. J., Knoshaug E. P., Adney W. S., Himmel M. E., Decker S. R. (2008): Synergistic enhancement of cellobiohydrolase performance on pretreated corn stover by addition of xylanase and esterase activities. *Bioresource Technology* 99, pp. 4997-5005
261. Silva E.M., Machuca A., Milagres A.M.F. (2005): Evaluating the growth and enzyme production from *Lentinula edodes* strains. *Process Biochemistry* 40, pp. 161-164
262. Singh R., Singh S., Trimukhe K. D., Pandare K. V., Bastawade K. B., Gokhale D. V., Varma A. J. (2005): Lignin-carbohydrate complexes from sugarcane bagasse: Preparation, purification and characterization. *Carbohydrate Polymers* 62, pp. 57-66
263. Sonakya V., Raizada N., Kalia V. C. (2001): Microbial and enzymatic improvement of anaerobic digestion of waste biomass. *Biotechnology letters* 23, pp. 1463-1466
264. Spiekers H. (2005): Empfehlungen zum Controlling am Silo.
<http://www.lfl.bayern.de/ite/futterkonservierung/12024/index.php> (Stand 22.2.2013)
265. Stamatelatos K., Antonopoulou G., Nkaikou I., Lyberatos G. (2012): The effect of Physical, Chemical and Biological Pretreatments of Biomass on its Anaerobic Digestibility and Biogas Production. In: Mudhoo A., Biogas production - Pretreatment methods in anaerobic digestion. Scrivener Publishing, 1. Auflage, ISBN 978-1-118-06285-2
266. Stenströmer Moglia E. (2008): Enzymatic pre-treatment of cellulose rich biomasses for use in the biogas process. Master thesis, Swedish University of Agricultural Sciences

267. Sticklen M. B. (2008): Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nature Reviews, Genetics*, Vol. 9, pp. 433-443
268. Stölken B. (2005): Roggen für die Bioethanolproduktion. http://www.landwirtschaft-mv.de/cms2/LFA_prod/LFA/content/de/Fachinformationen/Nachwachsende_Rohstoffe/Kraftstoffe/Roggen_fuer_die_Bioethanolproduktion/bioethanol-roggen266f0%5B1%5D.pdf (Stand 18.03.2013)
269. Stokes M. R. (1992): Effect of an Enzyme Mixture, an Inoculant, and Their Interaction on Silage Fermentation and Dairy Production. *Journal of Dairy Science* 75, pp. 764-773
270. Suarez Quinones T., Plöchl M., Budde J., Heiermann M. (2009): Do hydrolytic enzymes enhance methane formation of agricultural feedstock? Internationale Wissenschaftstagung Biogas Science 2009, Erding, 2.-4.12.2009, In: Schriftenreihe der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Band 1 – Vorträge, S. 137-149
271. Sun Z. H., Liu S. M., Tayo G. O., Tang S. X., Tan Z. L., Lin B., He Z. X., Hang X. F., Zhou Z. S., Wang M. (2009): Effects of cellulose or lactic acid bacteria on silage fermentation and in vitro gas production of several morphological fractions of maize stover. *Animal Feed Science and Technology* 152, pp. 219-231
272. Sun Y., Cheng J. (2002): Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 83, pp. 1-11
273. Sun R., Sun X. F., Wang S. Q., Zhu W., Wang X. Y. (2002): Ester and ether linkages between hydroxycinnamic acids and lignins from wheat, rice, rye, and barley straws, maize stems, and fast-growing poplar wood. *Industrial Crops and Products* 15, pp. 179-188
274. Taherzadeh M. J., Jeihanipour A. (2012): Recalcitrance of Lignocellulosic Biomass to Anaerobic Digestion. In: Mudhoo A., *Biogas production - Pretreatment methods in anaerobic digestion*. Scrivener Publishing, 1. Auflage, ISBN 978-1-118-06285-2
275. Tan Y. H., Wahab M. N. (1997): Extracellular enzyme production during anamorphic growth in the edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 13, pp. 613-617
276. Telschow D. (2006): Untersuchung des Einflusses von Enzymen auf die Biogasproduktion. Masterarbeit, Bauhaus-Universität Weimar
277. Tengerdy R. P., Szakacs G. (2003): Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13, pp. 169-179
278. Tetlow R. M., Mason V. C. (1987): Treatment of Whole-crop Cereals with Alkali. 1. The Influence of Sodium Hydroxide and Ensiling on the Chemical Composition and In Vitro Digestibility of Rye, Barley and Wheat Crops Harvested at Increasing Maturity and Dry Matter Content. *Animal Feed Science and Technology* 18, pp. 257-269
279. Thaysen J. (2010): Ganzpflanzensilage. Herausgeber: Rationalisierungs-Kuratorium für Landwirtschaft (RKL) <http://www.johannes-thaysen.de/assets/johannes-thaysen/Thaysen-Ganzpflanzensilage.pdf> (Stand 22.2.2013)
280. Thaysen J. (2008): Mehr Energie einspeisen. *Landpost*, S. 40-43
281. Thaysen J. (2007): Fehlgärungen. „SILOPROFI werden“, Osterrönnfeld, 6. März 2007
282. Tölderer S. (2001) Direkte fermentative Verwertung von Mais-Ernterückständen. Diplomarbeit, Technische Universität Graz
283. Tong X., Smith L. H., McCarty P. L. (1990): Methane Fermentation of Selected Lignocellulosic Materials. *Biomass* 21, pp. 239-255
284. Ulber R. (2009): Plattformchemikalien aus Silage. Deutscher Bioraffinerie-Kongress, Potsdam, 8.7.2009
285. Universität Göttingen, Forstbotanik (1997): Laccaseaktivitätsnachweis.
286. Van Soest P. J., Robertson J. B., Lewis B. A. (1991): Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science* 74, pp. 3583-3597

287. VDI (2006) - Verein Deutscher Ingenieure: Vergärung organischer Stoffe – Substratcharakterisierung, Probenahme, Stoffdatenerhebung, Gärversuche. VDI-Richtlinie 4630, VDI-Handbuch Energietechnik
288. VDLUFA (1997) – Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten: Methodenbuch – Band III. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. VDLUFA-Verlag, Speyer
289. Vervaeren H., Hostyn K., Ghekiere G., Willems B. (2010): Biological ensilage additives as pretreatment for maize to increase the biogas production. *Renewable Energy* 35, pp. 2089-2093
290. Vetter R. (1995): Alternative Kulturen, Nachwachsende Rohstoffe: Anbau von Energiepflanzen zur Ganzpflanzengewinnung mit verschiedenen Beerntungsmethoden; Schwachholzwertung. Bericht über die Versuchsjahre 1994-1995
291. Viehmann C. (2008): Perkolierte Feststoffvergärung von Stroh im Batchbetrieb bei Einsatz von Enzymen. Diplomarbeit, Bauhaus-Universität Weimar
292. Wallace G., Russell W. R., Lomax J. A., Jarvis M. C., Lapierre C., Chesson A. (1995): Extraction of phenolic-carbohydrate complexes from graminaceous cell walls. *Carbohydr. Res.* 272, pp. 41-53
293. Walker L. P., Wilson D. B. (1991): Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: An Overview. *Bioresource Technology* 36, pp. 3-14
294. Wang Y., McAllister T., Rode L., Beauchemin K., Morgavi D., Nsereko V., Iwaasa A., Yang W. (2002): Effects of exogenous fibrolytic enzymes on epiphytic microbial populations and in vitro digestion of silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82, pp. 760-768
295. Wang Y. T., Suidan M. T., Pfeffer J. T., Najam I. (1989): The effect of concentration of phenols on their batch methanogenesis. *Biotechnol. Bioeng.* 33 (10), pp. 1353-1357
296. Warthmann R., Baum S., Baier U., Meier U., Hersener J.-L. (2012): Massnahmen zur Optimierung der Vergärung - Durch Vorbehandlung, Prozess- und Verfahrenstechnik und Hilfsstoffe. Schlussbericht, ZHAW Zürcher Hochschule für angewandte Wissenschaften
297. Warzecha A. C. (2006): Untersuchungen zu Fütterungseinflüssen auf die Kotbeschaffenheit und –zusammensetzung bei Sauen. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover
298. Weiland P., Abdoun E. (2009): Untersuchung der funktionalen Zusammenhänge zwischen der Silierung und Methangärung verschiedener Energiepflanzen auf die Gasausbeute und Gasqualität. Abschlussbericht, Johann Heinrich von Thünen-Institut
299. Weiland P. (2006): Biogas - Stand und Perspektiven der Erzeugung und Nutzung in Deutschland. DAF-Tagung „Energie aus Biomasse“, Braunschweig, 25.-26.10.2006
300. Weiland P. (2003): Biologie der Biogaserzeugung. ZNR Biogastagung, Bad Sassendorf-Ostinghausen, 2.4.2003, http://www.biogas-infoboard.de/pdf/Biologie_der_Biogaserzeugung.pdf, (Stand 22.2.2013)
301. Weinberg Z. G., Ashbell G., Hen Y., Azrieli A. (1995): The effect of cellulase and hemicellulase plus pectinase on the aerobic stability and fibre analysis of peas and wheat silages. *Animal Feed Science and Technology* 55, pp. 287-293
302. Weiß D., Brückner C. (2008): Biomasseaufbereitung zur Vergärung. Schriftenreihe der Sächsischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Heft 19
303. Weiß K., Kaiser E. (2004): Ursachen der Nacherwärmung und deren Auswirkungen auf Futterwert und Hygiene von Grobfuttersilagen. Sächsischer Futtertag, Nossen, 14.4.2004
304. Weiß K. (2001): Gärungsverlauf und Gärqualität von Silagen aus nitratarmem Grünfutter. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin
305. Weißbach F. (1998): Über die Bestimmung der Gärverluste in Silierversuchen unter Laborbedingungen. 110. VDLUFA Kongress, Gießen, 14.-18.09.1998, In: VDLUFA Schriftenreihe 49, S. 461-464

306. Weißbach F. (1967): Die Bestimmung der Pufferkapazität der Futterpflanzen und ihre Bedeutung für die Beurteilung der Vergärbarkeit. Tagungsbericht Deutsch. Akad. Landwirtschaftswiss. Berlin 92, S. 211-220
307. Weß C. (2003): Abbau von ligninhaltigen Substraten durch Basidiomyceten - Bilanzierung des Abbaus und Identifizierung von niedermolekularen, phenolischen Abbauprodukten. Dissertation, Universität Hannover
308. Wingender J., Neu T. R., Felmming H. C. (1999): Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function. Springer-Verlag, 1. Auflage, ISBN 3-540-65720-7
309. Wong D. W. S. (2009): Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. Appl Biochem Biotechnol 157, pp. 174-209
310. Wong D. W. S. (2006): Feruloyl Esterase - A Key Enzyme in Biomass Degradation. Applied Biochemistry and Biotechnology Vol. 133, pp. 87-112
311. Wucher S. (2005): Welche Häcksellänge für Biogasanlagen? Lohnunternehmen, 3-4
312. Wulf S., Clemens J. (2009): Wertschöpfung aus nachwachsenden Rohstoffen: Untersuchungen zur Wirkung optimierter Enzympräparate auf die Effizienz der Enzymproduktion – Teilvorhaben 2: Gärversuche. Abschlussbericht
313. Wyss U. (2006): Siliermittel und aerobe Stabilität - Testergebnisse 2005. AGRARForschung 13 (8), S. 348-352
314. Wyss U. (2004): Silierbarkeit von verschiedenen Knaulgras- und Luzernesorten sowie Qualität der Silagen. Schriftenreihe Institut für Nutztierwissenschaften, ETH Zürich, Band 25
315. Xiao Z., Zhang X., Gregg D. J., Saddler J. N. (2004): Effects of Sugar Inhibition on Cellulases and β -Glucosidase During Enzymatic Hydrolysis of Softwood Substrates. Applied Biochemistry and Biotechnology 113-116, pp. 1115-1126
316. Ximenes E., Kim Y., Mosier N., Dien B., Ladisch M. (2010): Inhibition of cellulases by phenols. Enzyme and Microbial Technology 46, pp. 170-176
317. Xu F., Sun R.-C., Sun J.-X., Liu C.-F., He B.-H., Fan J.-S. (2005): Determination of cell wall ferulic and p-coumaric acids in sugarcane bagasse. Analytica Chimica Acta 552, pp. 207-217
318. Yadavika, Santosh, Sreekrishnan T. R., Kohli S., Rana V. (2004): Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques - a review. Bioresource Technology 95, pp. 1-10
319. Yoon K. Y., Woodams E. E., Hang Y. D. (2006): Enzymatic production of pentoses from the hemicellulose fraction of corn residues. LWT 39, pp. 387-391
320. Yu H., Liu R., Shen D., Wu Z., Huang Y. (2008): Arrangement of cellulose microfibrils in the wheat straw cell wall. Carbohydrate Polymers 72, pp. 122-127
321. Zacharias H., Plöchl M., Herrmann C., Heiermann M., Auerbach H. (2008): Welche Siliermittel für Biogassilage? Energiepflanzen effizienter in Methan umsetzen. Neue Landwirtschaft 8, S. 85-87
322. Zaunmüller T., Eichert M., Richter H., Uden G. (2006): Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugar and organic acids. Appl Microbial Biotechnol 72, pp. 421-429
323. Zebeli Q., Ametaj B. N., Junck B., Drochner W. (2009): Maize silage particle length modulates feeding patterns and milk composition in loose-housed lactating Holstein cows. Livestock Science 124, pp. 33-40
324. Zentgraf H., Poutanen K. (2007): Healthy and Good! Rye in Human Nutrition. Der Europäische Roggenkongress „Rye Europe 2007“, Berlin, 13.-14.6.2007
325. Zerr W. (2005): Prozessüberwachung und Betriebsoptimierung von Biogasanlagen.

326. Zieminski K., Romanowska I., Kowalska M. (2012): Enzymatic pretreatment of lignocellulosic wastes to improve biogas production. *Waste management* 32, pp. 1131-1137
327. Zhang Y.-H. P. (2008): Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* Vol. 35, No. 5, pp. 367-375
328. Zhu L., O'Dwyer J. P., Chang V. S., Granda C. B., Holtzapple M. T. (2008): Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. *Bioresource Technology* 99, pp. 3817-3828

8 Anhang

8.1 Enzymatische Vorbehandlung von Biogassubstraten

Tab. 8-1: Literaturwerte einstufiger Fermentationsprozesse - Enzymatische Vorbehandlung von Biogassubstraten während des Biogasprozesses

Substrat	Enzym/Enzymmix	Enzymkonzentration	Mehrertrag Methan[%]	Quelle
Batch-Gärtest (mesophil)				
Zwerghirse	Kernzyme	-	Kein Effekt	Nigatu <i>et al.</i> 2012
Gärsubstrat (Hauptfermenter)	Präparat A	Aufaddierte Enzymmenge		Brulé <i>et al.</i> 2011
		0,2 g/kg Gärsubstrat	+2 ^{n.s.}	
		2 g/kg Gärsubstrat	-3 ^{n.s.}	
	Präparat B + C	Aufaddierte Enzymmenge		
		0,2 g/kg Gärsubstrat	+5 ^{n.s.}	
		2 g/kg Gärsubstrat	+6 ^{n.s.}	
Gärsubstrat (Nachgärer)	Präparat A	Aufaddierte Enzymmenge		
		0,2 g/kg Gärsubstrat	+3 ^{n.s.}	
		2 g/kg Gärsubstrat	+7 ^{n.s.}	
	Präparat B + C	Aufaddierte Enzymmenge		
		0,2 g/kg Gärsubstrat	+2 ^{n.s.}	
		2 g/kg Gärsubstrat	+16 [*]	
Roggensilage	MethaPlus N 100	Einmalige Zugabe: 1 g/kg Silage	-25 ^{k.A.}	Schumann 2007
	MethaPlus S 110	Einmalige Zugabe: 1 g/kg Silage	-19 ^{k.A.}	
Gersterückstände	Cellupract AL 70	1000 ppm (100 mg Substrat)	+20 ^{k.A.} (Biogas)	Lüttich 2008
	E20071101	1000 ppm (100 mg Substrat)	+10 ^{k.A.} (Biogas)	
	Cellupract AL 70 + E20071101	1000 ppm (100 mg Substrat)	0 (Biogas)	
Grassilage	Cellupract AL 70	1000 ppm (100 mg Substrat)	+15 ^{k.A.} (Biogas)	Lüttich 2008
	E20071101	1000 ppm (100 mg Substrat)	+4 ^{k.A.} (Biogas)	
	Cellupract AL 70 + E20071101	1000 ppm (100 mg Substrat)	0 (Biogas)	
	Enzymmischung	10 mg	-0,5 ^{k.A.}	Weiß & Brückner 2008
	Enzymmischung + mechanische Aufarbeitung	20 mg	-5 ^{k.A.}	
				Lüttich 2008
	Cellupract AL 70	1000 ppm (100 mg Substrat)	+6 ^{k.A.} (Biogas)	
	E20071101	1000 ppm (100 mg Substrat)	+4 ^{k.A.} (Biogas)	
	Cellupract AL 70 + E20071101	1000 ppm (100 mg Substrat)	+2 ^{k.A.} (Biogas)	
Maissilage	Enzymmischung	10 mg	+7 ^{k.A.}	Weiß & Brückner 2008
	Enzymmischung + mechanische Aufarbeitung	20 mg	+3 ^{k.A.}	
	MethaPlus [®] S 100	100 g/t oTS	+14 ^{k.A.}	Telschow 2006
	Resinase A2X	-	+18 [*]	
	Novozym 342	-	+12 [*]	Amon 2005a
	Alcalase	-	-3 [*]	
	MethaPlus [®] S/L 100	200 g/t TS	+14 [*]	Kaiser 2004
	MethaPlus [®] L 100	1 g/kg TS, aktiv	+2 ^{n.s.}	Brulé <i>et al.</i> 2007
	Genencor Laminex BG	1 g/kg TS, aktiv/inaktiv	0/+2 ^{n.s.}	
	GoldFerm-Mais	1 g/kg TS, aktiv/inaktiv	+4 [*] /+3 ^{n.s.}	

Substrat	Enzym/Enzymmix	Enzymkonzentration	Mehrertrag Methan[%]	Quelle
	Novozyme 188	1 g/kg TS, aktiv/inaktiv	+1 ^{n.s.} /+3 [*]	
	MethaPlus [®] L 100	0,1 g/kg TS aktiv	+1 ^{n.s.}	
	Genencor Laminex BG	0,1 g/kg TS aktiv	+1 ^{n.s.}	
	GoldFerm-Mais	0,1 g/kg TS aktiv	0	
	Novozyme 188	0,1 g/kg TS aktiv	0	
Maisstroh	MethaPlus [®] L 100	1 g/kg TS, aktiv/inaktiv	-2 ^{n.s.} /+3 ^{n.s.}	
	Genencor Laminex BG	1 g/kg TS, aktiv/inaktiv	-2 ^{n.s.} /+3 ^{n.s.}	
	GoldFerm-Mais	1 g/kg TS, aktiv/inaktiv	+5 [*] /0	
	Novozyme 188	1 g/kg TS, aktiv/inaktiv	+1 ^{n.s.} /-2 ^{n.s.}	
	MethaPlus [®] L 100	0,1 g/kg TS aktiv	0	
	Genencor Laminex BG	0,1 g/kg TS aktiv	+1 ^{n.s.}	
	GoldFerm-Mais	0,1 g/kg TS aktiv	-1 ^{n.s.}	
	Novozyme 188	0,1 g/kg TS aktiv	0	
Kleeegrassilage	Resinase A2X	-	+40 ^{k.A.}	Amon 2005a
	Novozym 51008 L	-	+38 ^{k.A.}	
	Novozyme 342	-	+67 ^{k.A.}	
	Alcalase	-	-5 ^{k.A.}	
	Mixtur aller Enzyme	-	+14 ^{k.A.}	
Schilfgrassilage	MethaPlus [®] S 100	200 g/t TS + mechanische Aufarbeitung	+19 ^{s.}	Amon <i>et al.</i> 2007b
	MethaPlus [®] S 100 + Dampf	200 g/t TS + 0,4-0,8 atm, 109-116 °C, 1 h + mechanische Aufarbeitung	+9 ^{n.s.}	
Maissilage +Schweinegülle	Cellupract AL 100	10 ml/400 ml Gäransatz	+30 ^{k.A.} (Biogas)	Günther 2004a
Maishackschnitzel +Schweinegülle	MethaPlus [®] S 100	100 g/t oTS/ 300 g/t oTS/ 1000 g/t oTS	+6 ^{k.A.} +10 ^{k.A.} +18 ^{k.A.} (Biogas)	Günther 2004b
Topinambur- pellets	MethaPlus [®] L 100/S 100	L 100: 0,5 ml/1 g Pellets	+11 ^{k.A.}	Löwe 2004
		L 100: 0,55 ml/1 g Pellets	+12 ^{k.A.}	
		S 100: 0,1 g/1 g Pellets	+4 ^{k.A.}	
		S 100: 0,15 g/1 g Pellets	+1 ^{k.A.} (Biogas)	
Batch-Gärtest (thermophil)				
Weizengras	Novozyme 342	25 mg/g oTS	-6 ^{n.s.}	Romano <i>et al.</i> 2009
	85 % Celluclast 1.5L + 15 % Novozyme 188	25 mg/g oTS (zweistufige Fermentation)	+32 ^{n.s.}	
Technikumsversuche/Praxisversuche				
Maissilage (mesophil)	Cellulase + Amylase	1 ml/kg oTS, untersch. Raum- belastungen 1-2 g oTS/l)	+2-8 [*]	Lebuhn <i>et al.</i> 2010
	Cellulase + Amylase + β -Galactosidase	1 ml/kg oTS, untersch. Raum- belastungen 1-2 g oTS/l)	+3-11 [*]	
(thermophil)	Cellulase + Amylase	1 ml/kg oTS	Kein Effekt	
	Cellulase + Amylase + thermostabile Cellulase	1 ml/kg oTS	Kein Effekt	
	Thermostabile Cellulase + Amylase	1 ml/kg oTS	Geringer Effekt	
	Thermostabile Cellulase + Amylase + β -Galactosidase	1 ml/kg oTS	Kein Effekt	
	Enzymmischung + mechanische Aufarbeitung	-	+17 ^{k.A.}	
(mesophil)				Weiß & Brückner 2008
Verschiedene Substrate (meso- und thermophil)	MethaPlus [®] S/L 100	-	+4 bis +35 ^{k.A.} (Biogas)	Gerhardt 2007

Substrat	Enzym/Enzymmix	Enzymkonzentration	Mehrertrag Methan[%]	Quelle
Maissilage +Rindergülle (mesophil)	MethaPlus® S 100	100-1000 g/t oTS	+18 ^{k.A.}	Telschow 2006

MethaPlus® S/L/N 100 = β -Glucanase, Cellulase, Xylanase (*Trichoderma reesei*); MethaPlus® S 110 = β -Glucanase, Cellulase, Xylanase, Amylase (*Trichoderma reesei*); Novozyme 342 = Cellulase, Hemicellulase (*Humicola insolens*); Celluclast® 1.5 L = Cellulase (*Trichoderma reesei*); Novozyme 188 = β -Glucosidase (*Aspergillus niger*); Cellupract AL = Cellulase, Xylanase, β -Glucanase (*Trichoderma reesei*); E20071101 = Lipase (*Rhizopus oryzae*); Cellubrix L = Cellulase; Alcalase = Protease (*Bacillus licheniformis*); Novozyme 51008 L = Cellulase; Resinase A2X = Lipase; Genencor Laminex BG = Cellulase, Xylanase (*Trichoderma sp.*); GoldFerm-Mais = Enzym-Mikroorganismen Mischpräparat; n.s. = nicht signifikant ($p < 0,05$); s. = signifikante Differenz; k.A. = keine Angabe; *signifikante Differenz zur Variante ohne Enzymzusatz ($p < 0,05$)

8.2 Chemische Zusammensetzung der Rohstoffe, Silagen und Gärrückstände

8.2.1 Erweiterte Futtermittelanalyse

Tab. 8-2: Analysenergebnisse der Rohstoffe Mais und Roggen unterschiedlicher Erntejahre und Häcksellängen

		Mais 2005	Mais 2006	Mais 2005	Mais 2006	Roggen 2006	Roggen 2006	Roggen 2007
Häcksellänge		4 mm	4 mm	8 mm	8 mm	4 mm	8 mm	8 mm
TS	[%]	31,85	39,36	35,48	36,07	44,70	43,71	37,61
oTS	[% i.TS]	96,6	96,47	96,46	96,45	95,48	95,40	95,52
XA	[% i.TS]	3,61	3,55	4,20	3,92	4,66	4,81	4,48
XP	[% i.TS]	9,11	7,89	7,80	7,10	9,35	9,10	7,46
XL	[% i.TS]	3,04	3,37	2,67	3,50	1,85	1,76	1,68
XF	[% i.TS]	20,00	19,11	20,87	21,16	32,95	31,71	34,85
XX	[% i.TS]	64,24	66,08	64,46	64,32	50,73	52,14	51,53
NDF	[% i.TS]	42,85	41,90	45,17	44,96	58,14	58,52	61,93
ADF	[% i.TS]	21,41	20,37	22,13	23,04	33,98	34,57	38,41
ADL	[% i.TS]	2,56	2,17	2,66	2,36	4,94	5,12	4,75
Cellulose	[% i.TS]	18,85	18,2	19,47	20,68	29,04	29,45	33,66
Hemicellulose	[% i.TS]	21,44	21,53	23,04	21,92	24,16	23,95	23,52
WSC	[% i.TS]	9,30	5,99	7,12	6,77	18,44	17,30	7,92
NO ₃	[% i.TS]	0,24	0,24	0,16	0,37	1,05	1,33	0,17
NH ₄ -N	[% i.TS]	0,08	0,09	0,07	0,11	0,14	0,13	0,07
PK	[g MS/kg TS]	31,13	28,44	32,01	32,43	45,25	44,12	37,05
VK	-	56	56	53	53	77	75	55
C	[% i.TS]	49,73	46,20	49,27	46,19	46,79	46,77	49,66
N	[% i.TS]	1,44	1,28	1,39	1,30	1,57	1,57	1,60
S	[% i.TS]	0,11	0,12	0,13	0,11	0,17	0,22	0,16
C/N	-	35	36	35	36	30	30	31
pH-Wert	-	5,76	5,89	5,78	5,86	6,07	6,61	6,51

Tab. 8-3: Analysenergebnisse der Pilzsubstrate des Shiitake und Austernseitlings

		ST-1	ST-2	ST--3	AS-1	AS-2	AS-3
Zustand		Häcksel	Häcksel	Presssaft	Häcksel	Häcksel	Presssaft
TS	[%]	38,26	44,28	4,45	31,89	24,49	5,30
oTS	[% i.TS]	93,44	92,01	92,27	91,13	90,28	92,29
XA	[% i.TS]	6,56	7,99	7,73	8,87	9,72	7,71
XP	[% i.TS]	9,47	11,15	34,61	11,37	15,82	51,70
XL	[% i.TS]	0,28	0,42	-	0,11	0,34	-
XF	[% i.TS]	41,24	35,93	-	41,26	39,63	-
XX	[% i.TS]	41,88	44,51	-	37,77	34,49	-
NDF	[% i.TS]	67,90	60,60	-	68,75	63,66	-
ADF	[% i.TS]	45,04	42,22	-	45,61	44,57	-
ADL	[% i.TS]	7,47	8,48	-	10,34	10,65	-
Cellulose	[% i.TS]	37,57	33,74	-	35,27	33,92	-
Hemicellulose	[% i.TS]	22,86	18,38	-	23,14	19,09	-
WSC	[% i.TS]	1,46	1,39	-	0,32	0,61	-
NO ₃	[% i.TS]	0,03	0,03	-	0,03	0,03	-
NH ₄ -N	[% i.TS]	0,13	0,18	2,02	0,60	1,14	4,34
PK	[g MS/kg TS]	-	40,43	-	-	58,73	-
C	[% i.TS]	49,56	48,34	-	47,94	45,75	-
N	[% i.TS]	1,99	2,52	-	1,96	2,96	-
S	[% i.TS]	0,17	0,13	-	0,18	0,24	-
C/N	-	25	19	-	24	15	-
pH-Wert	-	4,47	4,09	4,60	6,31	6,31	6,41

ST-1 = Shiitake (1. Charge), AS-1 = Austernseitling (1. Charge), ST-2 = Shiitake (2. Charge), AS-2 = Austernseitling (2. Charge), ST-3 = Shiitake (3. Charge), AS-3 = Austernseitling (3. Charge)

Tab. 8-4: Analysenergebnisse der während der Silierung unbehandelten und enzymatisch behandelten Maissilagen von 2005 mit variierenden Häcksellängen

		MS	MS + B4	MS + B3	MS + B3/B4	MS	MS + B4	MS + B3	MS + B3/B4
Häcksellänge		4 mm	4 mm	4 mm	4 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm
TS	[%]	34,59	28,39	31,74	28,21	38,04	33,86	32,91	31,94
oTS	[% i.TS]	96,33	95,33	96,03	95,57	95,72	95,5	95,19	95,08
XA	[% i.TS]	4,08	4,26	4,03	4,34	4,03	4,20	4,43	4,61
XP	[% i.TS]	7,75	8,65	7,95	9,01	7,60	7,97	8,06	8,26
XL	[% i.TS]	3,56	4,44	3,14	3,17	2,54	3,46	2,56	3,47
XF	[% i.TS]	21,24	22,58	18,53	19,90	22,27	24,09	23,21	22,46
XX	[% i.TS]	63,37	60,07	66,35	63,58	63,56	60,28	61,74	61,20
NDF	[% i.TS]	45,20	49,68	38,24	42,15	47,77	48,10	45,61	44,13
ADF	[% i.TS]	23,23	24,36	20,25	21,32	23,66	25,91	22,26	22,56
ADL	[% i.TS]	2,97	2,74	2,91	2,65	2,63	3,81	2,94	3,00
Cellulose	[% i.TS]	20,26	21,62	17,34	18,67	21,03	22,1	19,32	19,56
Hemicellulose	[% i.TS]	21,97	25,32	17,99	20,83	24,11	22,19	23,35	21,57
WSC	[% i.TS]	1,92	6,27	4,87	9,98	1,25	2,74	2,78	11,87
NO ₃	[% i.TS]	0,16	0,23	0,22	0,26	0,08	0,08	0,12	0,12
NH ₄ -N	[% i.TS]	0,106	0,128	0,114	0,105	0,13	0,14	0,11	0,11
C	[% i.TS]	49,98	51,76	52,04	52,96	50,29	51,01	51,04	52,03
N	[% i.TS]	1,317	1,487	1,419	1,487	1,277	1,343	1,332	1,407
S	[% i.TS]	0,175	0,149	0,136	0,143	0,122	0,127	0,126	0,135
C/N	-	38	35	37	36	39	38	38	37
pH-Wert	-	3,84	3,81	3,78	3,78	3,91	3,86	3,87	3,86

MS = Maissilage, B3 = Cellulase, B4 = Pektinase

Tab. 8-5: Analysenergebnisse der während der Silierung unbehandelten und enzymatisch behandelten Maissilagen von 2006 mit variierenden Häcksellängen

		MS	MS + A3/B4	MS + A3/L	MS + B4/L	MS	MS + A3	MS + B4	MS + L	MS + A3/B4	MS + A3/L	MS + B4/L	MS + A3/B4/L
Häcksellänge		4 mm	4 mm	4 mm	4 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm
TS	[%]	38,92	37,84	38,59	38,51	36,19	35,00	34,56	34,76	34,42	34,38	35,52	34,34
oTS	[% i.TS]	96,63	96,30	96,34	96,32	96,31	96,23	96,29	96,25	96,22	96,12	96,19	96,27
XA	[% i.TS]	3,74	3,92	3,61	3,55	3,71	3,93	3,75	3,81	3,98	3,92	3,98	3,99
XP	[% i.TS]	7,70	8,39	8,07	7,69	7,79	8,34	7,99	7,75	8,09	7,68	7,67	8,32
XL	[% i.TS]	3,57	4,09	4,24	3,61	3,79	4,25	3,88	4,04	4,42	3,95	3,68	4,14
XF	[% i.TS]	19,91	18,52	16,60	20,61	19,14	16,44	18,93	18,51	17,65	18,75	17,81	17,90
XX	[% i.TS]	65,08	65,08	67,48	64,54	65,57	67,04	65,45	65,89	65,86	65,70	66,86	65,65
NDF	[% i.TS]	43,88	40,52	37,49	42,07	43,19	41,93	41,14	41,52	39,56	39,47	43,69	38,65
ADF	[% i.TS]	19,06	17,43	16,92	19,73	20,13	17,05	19,22	19,25	18,29	19,59	19,73	17,89
ADL	[% i.TS]	2,31	1,96	2,03	2,40	2,54	1,92	2,16	2,12	2,16	1,81	2,11	2,39
Cellulose	[% i.TS]	16,75	15,47	14,89	17,33	17,59	15,12	17,06	17,13	16,13	17,78	17,62	15,49
Hemicellulose	[% i.TS]	24,83	23,09	20,57	22,35	23,06	24,87	21,92	22,27	21,27	19,87	23,96	20,76
WSC	[% i.TS]	7,14	1,23	1,08	0,49	0,63	1,60	0,61	0,55	2,37	0,15	0,95	3,77
NO ₃	[% i.TS]	0,28	0,27	0,29	0,28	0,35	0,37	0,35	0,37	0,38	0,39	0,35	0,36
NH ₄ -N	[% i.TS]	0,13	0,14	0,13	0,12	0,12	0,13	0,13	0,14	0,13	0,12	0,13	0,13
C	[% i.TS]	50,31	51,36	51,04	50,34	50,45	50,95	50,45	50,62	51,64	51,45	50,54	51,37
N	[% i.TS]	1,43	1,53	1,51	1,40	1,42	1,53	1,44	1,41	1,52	1,45	1,44	1,54
S	[% i.TS]	0,12	0,13	0,12	0,11	0,14	0,13	0,12	0,13	0,13	0,12	0,12	0,13
C/N	-	35	34	34	36	36	33	35	36	34	35	35	33
pH-Wert	-	3,85	3,78	3,77	3,79	3,78	3,83	3,78	3,77	3,79	3,77	3,81	3,78

MS = Maissilage, A3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase

Tab. 8-6: Analysenergebnisse der während der Silierung unbehandelten und enzymatisch behandelten Roggensilagen von 2006 mit variierenden Häcksellängen

		RS	RS + A3/B4	RS + A3/L	RS + B4/L	RS	RS + A3	RS + B4	RS + L	RS + A3/B4	RS + A3/L	RS + B4/L	RS + A3/B4/L
Häcksellänge		4 mm	4 mm	4 mm	4 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm
TS	[%]	43,27	42,22	42,50	42,38	43,04	42,60	42,69	42,92	42,20	41,90	42,05	42,31
oTS	[% i.TS]	95,63	95,17	95,32	95,61	95,61	95,38	95,24	95,55	95,57	95,50	95,42	95,63
XA	[% i.TS]	4,81	4,99	4,67	4,75	4,92	5,15	4,56	4,86	4,92	4,92	4,59	4,65
XP	[% i.TS]	9,79	10,17	9,59	9,64	9,29	9,51	8,93	8,99	9,17	8,97	9,00	9,45
XL	[% i.TS]	2,60	2,65	3,02	2,73	2,36	2,45	2,29	2,45	2,35	2,38	2,15	2,32
XF	[% i.TS]	39,71	41,40	37,07	39,81	38,42	39,44	38,59	36,70	36,00	37,80	40,82	37,82
XX	[% i.TS]	43,09	40,79	45,65	43,07	45,01	43,45	45,63	47,00	47,56	45,93	43,44	45,76
NDF	[% i.TS]	64,65	67,63	61,77	65,72	61,37	60,14	61,55	62,51	58,09	59,68	63,45	59,38
ADF	[% i.TS]	36,55	38,73	34,56	36,67	37,59	37,75	37,03	34,32	33,80	37,06	38,65	36,28
ADL	[% i.TS]	5,03	6,07	5,07	5,31	5,63	5,78	5,56	4,89	5,08	5,44	5,61	5,37
Cellulose	[% i.TS]	31,52	32,66	29,49	31,36	31,96	31,97	31,47	29,43	28,72	31,62	33,04	30,91
Hemicellulose	[% i.TS]	28,1	28,9	27,21	29,05	23,78	22,39	24,52	28,19	24,29	22,62	24,8	23,10
WSC	[% i.TS]	4,08	3,48	2,79	4,54	8,39	8,00	7,25	8,64	10,91	6,63	5,68	6,31
NO ₃	[% i.TS]	0,51	0,44	0,41	0,51	0,49	0,56	0,55	0,52	0,55	0,55	0,53	0,50
NH ₄ -N	[% i.TS]	0,17	0,19	0,12	0,14	0,15	0,13	0,14	0,14	0,11	0,11	0,13	0,14
C	[% i.TS]	51,43	52,64	50,69	49,49	52,00	52,62	51,25	51,04	51,77	52,47	52,13	52,31
N	[% i.TS]	1,84	1,93	1,79	1,79	1,74	1,77	1,69	1,71	1,73	1,74	1,70	1,79
S	[% i.TS]	0,17	0,18	0,14	0,14	0,15	0,14	0,13	0,13	0,15	0,13	0,15	0,15
C/N	-	28	27	28	28	30	30	30	30	30	30	31	29
pH-Wert	-	4,25	4,23	4,22	4,25	4,24	4,21	4,22	4,22	4,22	4,23	4,24	4,24

RS = Roggensilage, A3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase

Tab. 8-7: Analysenergebnisse der während der Silierung unbehandelten und enzymatisch behandelten Roggensilagen von 2007 mit einer Häcksellänge von 8 mm

		RS	RS + B4/L-1	RS + A3/B4-1	RS + A3/B4/L-1	RS + B4/L-2	RS + A3/B4-2	RS + A3/B4/L-2	RS + ST-1	RS + AS-1
Häcksellänge		8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm
TS	[%]	36,51	36,31	35,43	35,69	35,39	35,32	35,25	36,92	37,73
oTS	[% i.TS]	94,86	95,08	94,90	94,97	95,20	94,19	95,03	95,09	95,00
XA	[% i.TS]	5,07	5,23	5,32	5,06	5,08	5,26	5,29	5,13	5,32
XP	[% i.TS]	8,86	9,35	9,41	9,31	9,27	9,28	9,64	9,12	9,65
XL	[% i.TS]	2,21	2,29	2,32	2,23	2,22	2,32	2,22	2,04	2,11
XF	[% i.TS]	36,44	35,19	33,95	34,54	34,91	34,59	35,61	37,33	34,50
XX	[% i.TS]	47,42	47,94	49,00	48,86	48,52	48,55	47,24	46,38	48,42
NDF	[% i.TS]	66,37	66,30	63,76	63,91	66,02	66,21	65,69	65,65	64,28
ADF	[% i.TS]	38,88	35,62	37,72	37,99	40,86	39,41	40,19	40,47	38,07
ADL	[% i.TS]	5,86	4,99	5,49	5,34	5,95	5,73	6,33	5,89	5,45
Cellulose	[% i.TS]	33,03	30,63	32,22	32,65	34,91	33,67	33,87	34,58	32,62
Hemicellulose	[% i.TS]	27,48	30,67	26,05	25,93	25,16	26,80	25,49	25,19	26,21
WSC	[% i.TS]	2,17	1,90	3,95	2,30	2,08	4,13	3,66	1,64	2,10
NO ₃	[% i.TS]	0,28	0,31	0,31	0,32	0,33	0,33	0,33	0,30	0,31
NH ₄ -N	[% i.TS]	0,19	0,28	0,26	0,28	0,33	0,33	0,30	0,22	0,33
C	[% i.TS]	50,65	50,58	51,07	50,76	50,27	51,10	51,01	50,56	49,94
N	[% i.TS]	1,67	1,77	1,79	1,79	1,75	1,90	1,80	1,72	1,82
S	[% i.TS]	0,16	0,15	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
C/N	-	30	29	29	28	29	27	28	29	27
pH-Wert	-	3,80	3,78	3,82	3,74	3,77	3,96	3,76	3,75	3,77

RS = Roggensilage, A3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase, ST-1 = Shiitake (1. Charge), AS-1 = Austernseitling (1. Charge), Enzym-1 = 0,07 g Enzym/kg Roggen, Enzym-2 = 0,14 g Enzym/kg Roggen

Tab. 8-8: Analysenergebnisse der direkt vor dem Biogasprozess behandelten und unbehandelten Roggensilagen von 2007 mit einer Häcksellänge von 8 mm

		RS Unbehandelt ⁺	RS Kontrolle ⁺⁺	RS + E	RS + W	RS + P	RS + E/W	RS + E/P	RS + W/P	RS + E/W/P
Häcksellänge		8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm
TS	[%]	36,23	35,64	35,82	18,74	35,57	18,87	35,76	18,82	18,54
oTS	[% i.TS]	95,49	95,29	95,22	95,32	95,17	95,28	95,24	95,33	95,32
XA	[% i.TS]	5,09	5,35	5,32	4,99	5,09	4,96	5,27	5,09	5,03
XP	[% i.TS]	8,27	8,55	8,27	8,41	8,33	8,09	8,24	8,41	8,13
XL	[% i.TS]	2,29	2,27	2,18	2,37	2,17	1,95	2,11	1,98	2,11
XF	[% i.TS]	33,92	34,22	33,66	35,31	32,81	38,42	33,57	34,19	33,53
XX	[% i.TS]	56,30	55,72	57,30	54,81	57,33	53,54	57,15	56,26	57,81
NDF	[% i.TS]	63,35	64,74	65,09	66,49	61,77	67,43	60,20	60,31	61,12
ADF	[% i.TS]	34,83	36,71	35,34	36,02	34,44	39,67	36,35	35,40	35,68
ADL	[% i.TS]	5,52	5,66	5,49	5,45	5,49	5,84	6,21	5,14	5,38
Cellulose	[% i.TS]	29,31	31,05	29,85	30,57	28,95	33,83	30,14	30,26	30,30
Hemicellulose	[% i.TS]	28,52	28,04	29,75	30,47	27,33	27,76	23,85	24,90	25,45
WSC	[% i.TS]	1,62	1,65	2,79	1,95	2,04	3,25	4,02	1,94	4,97
NO ₃	[% i.TS]	0,28	0,25	0,26	0,23	0,23	0,32	0,31	0,29	0,30
NH ₄ -N	[% i.TS]	0,14	0,16	0,15	0,16	0,16	0,14	0,16	0,14	0,12
C	[% i.TS]	49,14	49,34	49,84	49,71	49,06	50,29	50,09	49,27	49,45
N	[% i.TS]	1,57	1,61	1,58	1,59	1,59	1,53	1,61	1,59	1,58
S	[% i.TS]	0,50	0,50	0,17	0,20	0,38	0,16	0,17	0,17	0,15
C/N	-	31	31	32	31	31	33	31	31	31
pH-Wert	-	3,79	3,82	3,79	3,83	3,82	3,85	3,83	3,85	3,79

RS = Roggensilage, P = Pasteurisieren: 90 °C, 1 bar, 20 Minuten; E = Enzym: A3 + B4, 1 kg je Enzym/t TS Roggen; W = Wasser: 350 g Silage + 350 g Wasser; ⁺vor der 24-stündigen Behandlung, ⁺⁺nach der 24-stündigen Behandlung

Tab. 8-9: Analysenergebnisse der Gärrückstände des Maises unterschiedlicher Erntezeitpunkte und Häcksellängen

		Mais 2005	Mais 2006	Mais 2005	Mais 2006
Häcksellänge		4 mm	4 mm	8 mm	8 mm
TS	[%]	2,82	2,58	2,75	2,58
oTS	[% i.TS]	54,91	60,32	54,48	61,48
XA	[% i.TS]	48,99	42,52	48,28	43,25
XP	[% i.TS]	48,23	27,02	46,91	27,41
XL	[% i.TS]	-	-	-	-
XF	[% i.TS]	5,43	-	5,04	-
NDF	[% i.TS]	11,15	19,91	14,94	16,34
ADF	[% i.TS]	10,37	12,50	11,15	14,59
ADL	[% i.TS]	6,54	6,82	6,72	8,22
Cellulose	[% i.TS]	3,83	5,68	4,43	6,37
Hemicellulose	[% i.TS]	0,78	7,42	3,79	1,75
WSC	[% i.TS]	0	0	0	0
NO ₃	[% i.TS]	-	0,012	-	0,014
NH ₄ -N	[% i.TS]	4,15	0,89	4,29	0,90
pH-Wert	-	7,14	7,44	7,13	7,42

Tab. 8-10: Analysenergebnisse der Gärrückstände des Roggens unterschiedlicher Erntezeitpunkte und Häcksellängen

		Roggen 2006	Roggen 2006	Roggen 2007
Häcksellänge		4 mm	8 mm	8 mm
TS	[%]	2,57	2,72	2,88
oTS	[% i.TS]	57,98	58,82	58,46
XA	[% i.TS]	44,83	44,80	45,13
XP	[% i.TS]	28,80	30,65	27,32
XL	[% i.TS]	2,06	1,89	1,42
XF	[% i.TS]	7,41	8,40	15,81
NDF	[% i.TS]	20,29	21,57	15,83
ADF	[% i.TS]	11,68	12,80	15,78
ADL	[% i.TS]	5,81	6,70	9,61
Cellulose	[% i.TS]	5,87	6,1	6,17
Hemicellulose	[% i.TS]	8,61	8,77	0,054
WSC	[% i.TS]	0	0	-
NO ₃	[% i.TS]	0,024	-	0,015
NH ₄ -N	[% i.TS]	1,29	1,60	1,15
pH-Wert	-	7,42	7,42	7,46

Tab. 8-11: Analysenergebnisse der Gärückstände der während der Silierung unbehandelten und enzymatisch behandelten Maissilagen von 2005 mit variierenden Häcksellängen

		MS	MS + B4	MS + B3	MS + B3/B4	MS	MS + B4	MS + B3	MS + B3/B4
Häcksellänge		4 mm	4 mm	4 mm	4 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm
TS	[%]	3,21	3,14	3,15	3,15	3,13	3,42	3,14	3,30
oTS	[% i.TS]	60,69	60,04	59,69	60,64	59,72	60,61	60,09	62,68
XA	[% i.TS]	45,86	45,65	45,06	44,77	47,39	44,86	46,72	45,36
XP	[% i.TS]	48,91	50,00	51,75	51,83	51,44	50,00	50,64	49,70
XL	[% i.TS]	2,08	2,03	2,20	2,39	2,14	2,19	2,35	2,31
XF	[% i.TS]	16,29	18,57	19,83	21,92	17,11	25,42	22,10	23,08
NDF	[% i.TS]	18,77	21,30	21,47	21,58	18,38	22,16	22,44	17,08
ADF	[% i.TS]	10,52	10,20	10,21	10,79	11,24	10,80	11,32	10,66
ADL	[% i.TS]	6,24	5,93	5,97	6,08	6,46	6,10	6,44	6,02
Cellulose	[% i.TS]	4,28	4,26	4,24	4,71	4,78	4,70	4,88	4,64
Hemicellulose	[% i.TS]	8,26	11,10	11,26	10,78	7,14	11,37	11,12	6,42
WSC	[% i.TS]	0	0	0	0	0	0	0	0
NO ₃	[% i.TS]	0,036	0,024	0,024	0,024	-	0,024	0,036	0,024
NH ₄ -N	[% i.TS]	4,24	4,39	4,41	4,52	4,57	4,21	4,39	4,21
pH-Wert		7,46	7,42	7,40	7,40	7,33	7,65	7,53	7,38

MS = Maissilage, B3 = Cellulase, B4 = Pektinase

Tab. 8-12: Analysenergebnisse der Gärückstände der während der Silierung unbehandelten und enzymatisch behandelten Maissilagen von 2006 mit variierenden Häcksellängen

		MS	MS + A3/B4	MS + A3/L	MS + B4/L	MS	MS + A3	MS + B4	MS + L	MS + A3/B4	MS + A3/L	MS + B4/L	MS + A3/B4/L
Häcksellänge		4 mm	4 mm	4 mm	4 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm
TS	[%]	2,28	2,20	2,31	2,33	2,42	2,31	2,39	2,43	2,58	2,43	2,70	2,25
oTS	[% i.TS]	60,95	62,49	61,41	62,35	61,33	61,40	61,04	60,64	60,72	59,28	63,21	61,75
XA	[% i.TS]	42,20	41,54	41,51	42,38	41,92	42,76	44,51	44,22	44,11	45,42	42,98	43,25
XP	[% i.TS]	27,75	29,46	28,41	-	-	27,47	27,94	28,28	27,75	28,48	27,39	27,66
XL	[% i.TS]	1,30	1,26	1,21	1,11	1,13	1,25	1,20	0,91	1,13	1,21	1,25	1,26
XF	[% i.TS]	15,02	8,93	11,93	11,73	14,49	11,97	16,01	17,87	12,65	13,04	12,84	10,76
NDF	[% i.TS]	14,39	12,74	13,66	12,14	13,51	11,97	14,16	12,55	15,01	14,81	11,39	17,37
ADF	[% i.TS]	11,52	11,03	10,24	12,89	11,74	12,36	12,09	10,77	9,14	10,50	9,77	10,33
ADL	[% i.TS]	7,04	6,69	6,67	8,01	7,14	7,15	7,63	6,48	5,54	6,35	6,15	6,26
Cellulose	[% i.TS]	4,48	4,34	3,58	4,89	4,59	5,21	4,46	4,30	3,60	4,16	3,62	4,08
Hemicellulose	[% i.TS]	2,87	1,71	3,41	-	1,78	-	2,07	1,78	5,87	4,30	1,63	7,04
WSC	[% i.TS]	0,17	0,15	0,14	0,15	0,13	0,13	0,14	0,16	0,14	0,15	0,13	0,16
NO ₃	[% i.TS]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NH ₄ -N	[% i.TS]	1,02	1,04	0,92	-	-	0,80	0,98	1,06	1,04	1,09	0,93	0,98
pH-Wert	-	7,37	7,38	7,38	7,35	7,37	7,40	7,38	7,34	7,39	7,41	7,40	7,37

MS = Maissilage, A3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase

Tab. 8-13: Analysenergebnisse der GÄRRÜCKSTÄNDE der während der Silierung unbehandelten und enzymatisch behandelten Roggensilagen von 2006 mit variierenden Häcksellängen

		RS	RS + A3/B4	RS + A3/L	RS + B4/L	RS	RS + A3	RS + B4	RS + L	RS + A3/B4	RS + A3/L	RS + B4/L	RS + A3/B4/L
Häcksellänge		4 mm	4 mm	4 mm	4 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm
TS	[%]	3,13	3,43	3,62	3,31	3,58	3,31	3,62	3,49	3,30	3,40	3,19	3,86
oTS	[% i.TS]	57,21	57,03	58,20	55,04	58,55	54,53	59,00	58,59	57,80	60,63	56,54	61,73
XA	[% i.TS]	47,73	52,11	52,55	58,93	51,55	49,92	50,92	50,04	50,51	48,67	49,96	52,72
XP	[% i.TS]	22,19	22,13	22,35	21,84	21,24	22,44	23,15	24,38	23,95	24,02	23,10	21,96
XL	[% i.TS]	2,45	2,44	-	-	2,25	2,23	2,22	2,52	1,62	1,88	2,24	1,82
XF	[% i.TS]	12,68	11,58	8,04	8,45	12,41	11,62	13,51	13,03	11,03	12,09	13,64	14,89
NDF	[% i.TS]	21,80	20,19	-	14,61	14,69	17,59	16,72	22,93	18,00	-	20,88	17,92
ADF	[% i.TS]	12,78	14,06	-	-	14,31	14,51	15,05	15,43	13,62	14,91	13,90	15,65
ADL	[% i.TS]	7,55	8,11	-	-	8,29	7,84	8,77	8,97	7,49	8,29	8,22	7,27
Cellulose	[% i.TS]	5,23	5,95	-	-	6,03	6,67	6,28	6,46	6,13	6,62	5,68	8,38
Hemicellulose	[% i.TS]	9,02	6,13	-	-	0,38	3,08	1,67	7,50	4,38	-	6,99	2,27
WSC	[% i.TS]	0,60	0	0,46	0	0	0	0,026	0	0	0	0	0
NO ₃	[% i.TS]	0,017	0,021	0,020	0,087	0,023	0,018	0,022	0,024	0,022	0,019	0,021	0,021
NH ₄ -N	[% i.TS]	0,71	0,59	0,60	0,76	0,63	0,65	0,75	0,96	0,89	1,00	0,91	0,60
pH-Wert	-	7,48	7,43	7,44	-	7,40	7,46	7,45	7,44	7,48	7,46	7,46	7,48

RS = Roggensilage, A3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase

Tab. 8-14: Analysenergebnisse der Gärrückstände der während der Silierung unbehandelten und enzymatisch behandelten Roggensilagen von 2007 mit einer Häcksellänge von 8 mm

		RS	RS + B4/L-1	RS + A3/B4-1	RS + A3/B4/L-1	RS + B4/L-2	RS + A3/B4-2	RS + A3/B4/L-2	RS + ST-1	RS + AS-1
Häcksellänge		8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm
TS	[%]	3,63	3,25	3,50	3,60	3,21	3,37	3,27	3,52	3,75
oTS	[% i.TS]	60,74	60,77	61,77	62,32	60,75	61,99	61,21	61,43	61,03
XA	[% i.TS]	41,68	39,94	41,91	39,90	41,50	41,78	41,86	42,02	42,01
XP	[% i.TS]	29,31	29,99	28,84	29,48	29,18	29,18	29,35	28,50	30,38
XL	[% i.TS]	2,12	2,15	2,14	2,27	2,28	1,84	1,49	1,66	1,67
XF	[% i.TS]	10,77	8,80	13,93	11,44	12,21	13,48	26,58	11,80	11,57
NDF	[% i.TS]	11,24	13,52	15,95	15,08	16,16	16,02	16,48	18,39	19,05
ADF	[% i.TS]	13,48	16,45	15,60	14,55	15,23	12,38	12,73	17,54	12,20
ADL	[% i.TS]	7,94	8,55	8,42	7,20	9,45	7,02	7,22	11,93	7,14
Cellulose	[% i.TS]	5,54	7,90	7,18	7,35	5,78	5,36	5,52	5,61	5,06
Hemicellulose	[% i.TS]	-	-	0,35	0,54	0,94	3,64	3,74	0,85	6,85
WSC	[% i.TS]	-	0,20	0,16	0,10	0,12	0,11	0,14	0,10	-
NO ₃	[% i.TS]	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NH ₄ -N	[% i.TS]	1,26	1,16	1,08	1,16	1,23	1,11	1,16	1,11	1,29
pH-Wert	-	7,30	7,35	7,37	7,33	7,33	7,34	7,33	7,35	7,30

RS = Roggensilage, A3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase, ST-1 = Shiitake (1. Charge), AS-1 = Austernseitling (1. Charge), Enzym-1 = 0,07 g Enzym/kg Roggen, Enzym-2 = 0,14 g Enzym/kg Roggen

Tab. 8-15: Analysenergebnisse der Gärrückstände der direkt vor dem Biogasprozess unbehandelten und enzymatisch behandelten Roggensilagen von 2007 mit einer Häcksellänge von 8 mm

		RS	RS + E	RS + W	RS + P	RS + E/W	RS + E/P	RS + W/P	RS + E/W/P
Häcksellänge		8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm
TS	[%]	2,69	2,80	2,52	2,66	2,62	2,78	2,55	2,57
oTS	[% i.TS]	64,39	66,45	63,51	64,09	65,45	66,37	63,70	63,13
XA	[% i.TS]	37,94	38,85	41,36	-	41,33	39,01	40,83	41,65
XP	[% i.TS]	34,85	34,91	35,46	-	33,89	33,63	35,02	36,37
XL	[% i.TS]	0,70	0,81	0,73	-	0,95	-	0,79	0,74
XF	[% i.TS]	13,51	10,78	-	-	7,35	10,29	10,77	9,66
NDF	[% i.TS]	-	14,88	-	-	9,20	18,42	12,35	8,94
ADF	[% i.TS]	9,49	9,97	9,12	-	7,66	8,91	9,06	8,68
ADL	[% i.TS]	5,60	6,25	6,34	-	5,39	5,01	5,91	6,12
Cellulose	[% i.TS]	3,89	3,72	2,79	-	2,27	3,90	3,15	2,57
Hemicellulose	[% i.TS]	-	4,91	-	-	1,54	9,51	3,29	0,26
WSC	[% i.TS]	0,079	0,092	0,094	-	0,099	0,085	-	0,069
NO ₃	[% i.TS]	0,037	0,035	0,040	-	0,035	0,039	0,035	0,039
NH ₄ -N	[% i.TS]	1,52	1,52	1,81	-	1,65	1,71	1,60	1,63
pH-Wert	-	7,23	7,16	7,22	7,26	7,25	7,22	7,27	7,24

RS = Roggensilage, P = Pasteurisieren: 90 °C, 1 bar, 20 Minuten; E = Enzym: A3 + B4, 1 kg je Enzym /t TS Roggen; W = Wasser: 350 g Silage + 350 g Wasser

Tab. 8-16: Analyseergebnisse der Gärrückstände der während des Biogasprozesses unbehandelten und enzymatisch behandelten Maissilagen von 2006 mit variierenden Häcksellängen

		MS	MS + A1/B1	MS + A1/L	MS + B1/L	MS	MS + A1	MS + B1	MS + L	MS + A1/B1	MS + A1/L	MS + B1/L	MS + A1/B1/L
Häcksellänge		4 mm	4 mm	4 mm	4 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm
TS	[%]	2,56	2,54	2,51	2,77	2,68	2,55	2,69	2,50	2,66	2,73	2,63	2,77
oTS	[% i.TS]	56,28	56,77	55,94	56,45	57,31	57,07	55,95	56,12	56,64	56,25	55,62	56,27
XA	[% i.TS]	48,18	48,60	48,76	50,22	49,55	48,90	51,08	52,15	49,23	51,28	49,83	48,88
XP	[% i.TS]	27,28	27,57	27,71	25,21	26,73	23,91	26,51	31,63	30,37	30,65	31,40	30,74
XL	[% i.TS]	1,01	1,02	1,10	1,28	1,40	1,59	1,59	0,92	1,33	0,98	0,79	1,16
XF	[% i.TS]	9,62	12,03	11,19	12,74	9,75	10,24	9,89	11,61	8,39	8,79	10,92	11,19
NDF	[% i.TS]	13,01	9,53	13,41	13,99	10,24	11,61	11,58	10,95	12,20	15,01	12,90	12,15
ADF	[% i.TS]	8,96	10,58	9,66	10,89	9,69	11,91	10,85	8,94	9,97	9,64	9,13	7,79
ADL	[% i.TS]	5,71	6,03	6,54	7,07	6,23	6,99	7,16	5,68	7,03	6,14	5,85	5,12
Cellulose	[% i.TS]	3,24	4,55	3,11	3,81	3,46	4,20	3,69	3,26	2,94	3,50	3,28	2,67
Hemicellulose	[% i.TS]	4,05	-	3,75	3,11	0,56	0,42	0,73	2,00	2,23	5,37	3,77	4,36
WSC	[% i.TS]	0,14	0,14	0,14	0,17	0,17	0,16	0,13	0,10	0,079	0,083	0,076	0,062
NO ₃	[% i.TS]	0,026	0,028	0,026	0,032	0,026	0,026	0,022	0,020	0,026	0,025	0,027	0,024
NH ₄ -N	[% i.TS]	1,19	1,31	1,27	1,20	1,18	0,98	1,31	1,88	1,54	1,58	1,78	1,58
pH-Wert	-	7,22	7,24	7,20	7,21	7,24	7,25	7,20	7,23	7,18	7,19	7,20	7,23

MS = Maissilage, A1 = Cellulase, B1 = Pektinase, L = Laccase

Tab. 8-17: Analysenergebnisse der Gärrückstände der während des Biogasprozesses unbehandelten und enzymatisch behandelten Roggensilagen von 2006 mit variierenden Häcksellängen

		RS	RS + A1/B1	RS + A1/L	RS + B1/L	RS	RS + A1	RS + B1	RS + L	RS + A1/B1	RS + A1/L	RS + B1/L	RS + A1/B1/L
Häcksellänge		4 mm	4 mm	4 mm	4 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm
TS	[%]	2,89	2,99	3,02	2,79	3,03	2,71	2,93	2,87	3,17	2,88	2,78	3,01
oTS	[% i.TS]	58,28	58,65	58,66	57,40	59,28	58,11	59,94	58,28	59,36	58,31	59,33	59,06
XA	[% i.TS]	45,69	44,97	45,84	44,08	44,31	44,29	44,87	44,49	45,37	43,98	43,93	43,66
XP	[% i.TS]	28,60	27,63	28,68	26,98	29,15	29,21	27,28	28,54	29,48	29,14	28,99	27,45
XL	[% i.TS]	1,75	2,03	1,89	2,06	2,31	1,40	1,11	1,20	1,24	1,27	1,14	2,19
XF	[% i.TS]	12,85	9,58	10,64	9,67	10,40	12,77	10,82	10,53	12,86	15,86	11,31	7,86
NDF	[% i.TS]	17,55	18,79	17,65	16,22	18,20	15,75	19,16	21,01	20,17	17,65	21,77	20,29
ADF	[% i.TS]	14,56	13,74	14,85	14,32	13,50	15,26	14,81	13,29	13,52	15,25	12,07	15,57
ADL	[% i.TS]	9,19	8,93	10,17	8,95	9,13	9,87	9,23	8,09	8,57	8,66	7,83	9,47
Cellulose	[% i.TS]	5,37	4,81	4,68	5,38	4,37	5,39	5,58	5,20	4,96	6,59	4,24	6,11
Hemicellulose	[% i.TS]	2,30	5,05	2,80	1,90	4,70	0,49	4,35	7,71	6,65	2,40	9,70	4,72
WSC	[% i.TS]	-	-	-	-	-	0,13	0,13	0,15	0,12	0,16	0,12	0,12
NO ₃	[% i.TS]	-	-	0,021	-	0,013	0,016	0,015	-	0,015	0,014	0,013	0,013
NH ₄ -N	[% i.TS]	1,13	1,02	1,07	0,97	1,24	1,18	1,12	1,14	1,29	1,31	1,22	1,04
pH-Wert	-	7,46	7,48	7,46	7,48	7,46	7,48	7,48	7,46	7,42	7,43	7,45	7,48

RS = Roggensilage, A1 = Cellulase, B1 = Pektinase, L = Laccase

Tab. 8-18: Analysenergebnisse der Gärrückstände der während des Biogasprozesses mit Pilzsubstraten enzymatisch behandelten Roggensilagen von 2007

		Shiitake-2		Shiitake-3		Shiitake-3		Austernseitling-2		Austernseitling-3		Austernseitling-3	
Zustand/ Behandlung		Häcksel	Presssaft	Presssaft	Presssaft/Rühren	Häcksel	Presssaft	Presssaft	Presssaft/Rühren	Häcksel	Presssaft	Presssaft	Presssaft/Rühren
TS	[%]	3,61	2,65		2,81	3,19	2,70		2,58				
oTS	[% i.TS]	62,22	63,97		64,08	60,90	63,99		63,41				
XA	[% i.TS]	40,85	40,17		40,71	42,80	40,33		40,22				
XP	[% i.TS]	30,23	32,99		35,77	30,35	33,90		35,15				
XL	[% i.TS]	1,93	1,86		0,85	1,51	0,94		0,81				
XF	[% i.TS]	12,69	13,06		14,27	25,50	12,84		9,66				
NDF	[% i.TS]	20,45	13,33		12,94	18,54	14,68		11,22				
ADF	[% i.TS]	13,51	10,90		11,22	15,30	10,47		10,10				
ADL	[% i.TS]	7,92	6,58		6,39	8,56	6,50		5,80				
Cellulose	[% i.TS]	5,58	4,32		4,83	6,74	3,97		4,30				
Hemicellulose	[% i.TS]	6,94	2,43		1,71	3,24	4,20		1,13				
WSC	[% i.TS]	0,10	-		0,10	0,08	-		0,12				
NO ₃	[% i.TS]	0	0,035		0,039	0	0,040		0,035				
NH ₄ -N	[% i.TS]	1,35	1,48		1,69	1,14	1,60		1,81				
pH-Wert	-	7,38	7,23		7,30	7,39	7,24		7,28				

ST-2 = Shiitake (2. Charge), AS-2 = Austernseitling (2. Charge), ST-3 = Shiitake (3. Charge), AS-3 = Austernseitling (3. Charge)

Tab. 8-19: Analysenergebnisse sowie Abbaugrade ausgewählter Inhaltsstoffe des zum Batch-Gärtest von Mais des Erntejahres 2005 verwendeten Faulschlamm

Faulschlamm 1		Faulschlamm Substrat	Faulschlamm Gärprodukt	Abbaugrad [%]
TS	[%]	2,97	2,51	16
oTS	[% i.TS]	58,49	53,92	23
XA	[% i.TS]	45,88	49,23	10
XP	[% i.TS]	29,45	51,54	-
XL	[% i.TS]	2,28	-	-
XF	[% i.TS]	4,48	2,82	47
NDF	[% i.TS]	9,82	8,32	29
ADF	[% i.TS]	3,31	7,78	0
ADL	[% i.TS]	4,07	5,37	0
Cellulose	[% i.TS]	-	2,41	-
Hemicellulose	[% i.TS]	6,51	0,55	93
WSC	[% i.TS]	0	0	0
NO ₃	[% i.TS]	0,03	-	-
NH ₄ -N	[% i.TS]	0,73	4,58	0
C	[% i.TS]	-	-	-
N	[% i.TS]	-	-	-
S	[% i.TS]	-	-	-
C/N	-	-	-	-
pH-Wert	-	-	7,29	-

Tab. 8-20: Analysenergebnisse sowie Abbaugrade ausgewählter Inhaltsstoffe des zum Batch-Gärtest der während der Silierung unbehandelten und enzymatisch behandelten Maissilagen des Erntejahres 2005 verwendeten Faulschlamm

Faulschlamm 2/3		Faulschlamm Substrat	Faulschlamm Gärprodukt	Abbaugrad [%]
TS	[%]	3,85	2,95	24
oTS	[% i.TS]	63,12	58,23	30
XA	[% i.TS]	44,38	48,52	17
XP	[% i.TS]	45,78	54,24	10
XL	[% i.TS]	2,12	2,24	20
XF	[% i.TS]	4,48	13,48	0
NDF	[% i.TS]	15,63	13,16	36
ADF	[% i.TS]	8,38	7,97	28
ADL	[% i.TS]	5,62	5,42	26
Cellulose	[% i.TS]	2,76	2,54	30
Hemicellulose	[% i.TS]	7,25	5,19	45
WSC	[% i.TS]	0	0	0
NO ₃	[% i.TS]	0,050	-	-
NH ₄ -N	[% i.TS]	3,38	4,47	0
C	[% i.TS]	31,79	-	-
N	[% i.TS]	5,43	-	-
S	[% i.TS]	1,92	-	-
C/N	-	6	-	-
pH-Wert	-	7,54	7,79	-

Tab. 8-21: Analysenergebnisse sowie Abbaugrade ausgewählter Inhaltsstoffe des zum Batch-Gärtest von Roggen des Erntejahres 2006 verwendeten Faulschlamm

Faulschlamm 4		Faulschlamm Substrat	Faulschlamm Gärprodukt	Abbaugrad [%]
TS	[%]	3,09	2,13	31
oTS	[% i.TS]	59,55	50,23	42
XA	[% i.TS]	46,80	47,52	30
XP	[% i.TS]	35,05	31,10	39
XL	[% i.TS]	2,38	2,21	36
XF	[% i.TS]	4,80	4,41	37
NDF	[% i.TS]	14,88	10,46	52
ADF	[% i.TS]	9,40	9,10	34
ADL	[% i.TS]	6,21	5,84	35
Cellulose	[% i.TS]	3,19	3,26	30
Hemicellulose	[% i.TS]	5,48	1,36	83
WSC	[% i.TS]	0	0	0
NO ₃	[% i.TS]	-	0,024	-
NH ₄ -N	[% i.TS]	1,60	1,37	41
C	[% i.TS]	30,84	29,15	24
N	[% i.TS]	5,49	4,79	30
S	[% i.TS]	1,59	1,58	20
C/N	-	6	-	-
pH-Wert	-	7,35	7,51	-

Tab. 8-22: Analysenergebnisse sowie Abbaugrade ausgewählter Inhaltsstoffe des zum Batch-Gärtest der während der Silierung unbehandelten und enzymatisch behandelten Roggensilagen des Erntejahres 2006 verwendeten Faulschlamm

Faulschlamm 5/6		Faulschlamm Substrat	Faulschlamm Gärprodukt	Abbaugrad [%]
TS	[%]	3,58	2,62	27
oTS	[% i.TS]	55,67	50,94	33
XA	[% i.TS]	52,00	52,31	27
XP	[% i.TS]	35,86	22,29	55
XL	[% i.TS]	1,83	1,88	25
XF	[% i.TS]	4,91	10,09	0
NDF	[% i.TS]	14,64	-	-
ADF	[% i.TS]	9,22	8,99	29
ADL	[% i.TS]	5,54	5,87	23
Cellulose	[% i.TS]	3,68	3,12	38
Hemicellulose	[% i.TS]	5,42	-	-
WSC	[% i.TS]	-	0	-
NO ₃	[% i.TS]	0,024	0,024	26
NH ₄ -N	[% i.TS]	2,46	0,68	80
C	[% i.TS]	28,65	-	-
N	[% i.TS]	4,38	-	-
S	[% i.TS]	1,63	-	-
C/N	-	7	-	-
pH-Wert	-	7,45	7,54	-

Tab. 8-23: Analysenergebnisse sowie Abbaugrade ausgewählter Inhaltsstoffe des zum Batch-Gärtest von Mais des Erntejahres 2006 verwendeten Faulschlamm

Faulschlamm 7		Faulschlamm Substrat	Faulschlamm Gärprodukt	Abbaugrad [%]
TS	[%]	2,88	2,40	17
oTS	[% i.TS]	63,80	57,46	25
XA	[% i.TS]	36,20	42,54	3
XP	[% i.TS]	48,83	25,94	56
XL	[% i.TS]	2,06	-	-
XF	[% i.TS]	7,29	-	-
NDF	[% i.TS]	15,19	13,44	27
ADF	[% i.TS]	8,73	9,78	7
ADL	[% i.TS]	5,62	6,27	7
Cellulose	[% i.TS]	3,11	3,51	6
Hemicellulose	[% i.TS]	6,46	3,66	53
WSC	[% i.TS]	0	0	0
NO ₃	[% i.TS]	0,012	< 0,08	-
NH ₄ -N	[% i.TS]	3,51	0,88	79
C	[% i.TS]	37,25	-	-
N	[% i.TS]	5,69	-	-
S	[% i.TS]	2,09	-	-
C/N	-	7	-	-
pH-Wert	-	7,22	7,52	-

Tab. 8-24: Analysenergebnisse sowie Abbaugrade ausgewählter Inhaltsstoffe des zum Batch-Gärtest der während der Silierung unbehandelten und enzymatisch behandelten Maissilagen des Erntejahres 2006 verwendeten Faulschlamm

Faulschlamm 8		Faulschlamm Substrat	Faulschlamm Gärprodukt	Abbaugrad [%]
TS	[%]	2,63	2,12	20
oTS	[% i.TS]	64,64	60,30	25
XA	[% i.TS]	39,93	43,48	13
XP	[% i.TS]	50,57	50,94	19
XL	[% i.TS]	2,02	1,53	39
XF	[% i.TS]	7,26	10,22	0
NDF	[% i.TS]	14,79	11,36	38
ADF	[% i.TS]	9,44	10,82	8
ADL	[% i.TS]	5,74	6,95	3
Cellulose	[% i.TS]	3,69	3,86	16
Hemicellulose	[% i.TS]	5,36	0,54	92
WSC	[% i.TS]	0	0,20	-
NO ₃	[% i.TS]	0,025	< 0,2	-
NH ₄ -N	[% i.TS]	3,42	5,19	0
C	[% i.TS]	37,62	-	-
N	[% i.TS]	5,96	-	-
S	[% i.TS]	1,95	-	-
C/N	-	6	-	-
pH-Wert	-	7,29	7,45	-

Tab. 8-25: Analysenergebnisse sowie Abbaugrade ausgewählter Inhaltsstoffe des zum Batch-Gärtest der während des Biogasprozesses unbehandelten und enzymatisch behandelten Maissilagen des Erntejahres 2006 verwendeten Faulschlamm

Faulschlamm 9		Faulschlamm Substrat	Faulschlamm Gärprodukt	Abbaugrad [%]
TS	[%]	2,93	2,47	16
oTS	[% i.TS]	61,07	54,32	25
XA	[% i.TS]	45,34	50,43	7
XP	[% i.TS]	49,15	-	-
XL	[% i.TS]	2,05	1,10	55
XF	[% i.TS]	8,49	12,24	0
NDF	[% i.TS]	13,86	10,23	38
ADF	[% i.TS]	8,08	9,50	1
ADL	[% i.TS]	4,63	7,12	0
Cellulose	[% i.TS]	3,45	2,38	42
Hemicellulose	[% i.TS]	5,78	0,73	89
WSC	[% i.TS]	0,12	0,17	0
NO ₃	[% i.TS]	0,021	0,025	0
NH ₄ -N	[% i.TS]	3,75	-	-
C	[% i.TS]	34,78	-	-
N	[% i.TS]	6,22	-	-
S	[% i.TS]	1,73	-	-
C/N	-	6	-	-
pH-Wert	-	7,26	7,30	-

Tab. 8-26: Analysenergebnisse sowie Abbaugrade ausgewählter Inhaltsstoffe des zum Batch-Gärtest der während des Biogasprozesses unbehandelten und enzymatisch behandelten Roggensilagen des Erntejahres 2006 sowie von Roggen des Erntejahres 2007 verwendeten Faulschlamm

Faulschlamm 10		Faulschlamm Substrat	Faulschlamm Gärprodukt	Abbaugrad [%]
TS	[%]	3,12	2,52	20
oTS	[% i.TS]	60,58	54,95	27
XA	[% i.TS]	45,53	48,34	15
XP	[% i.TS]	44,23	29,26	47
XL	[% i.TS]	1,50	1,65	11
XF	[% i.TS]	8,30	8,20	21
NDF	[% i.TS]	12,43	13,25	14
ADF	[% i.TS]	8,88	12,11	0
ADL	[% i.TS]	5,91	8,56	0
Cellulose	[% i.TS]	2,97	3,55	4
Hemicellulose	[% i.TS]	3,55	1,14	74
WSC	[% i.TS]	0,17	-	-
NO ₃	[% i.TS]	<0,05	-	-
NH ₄ -N	[% i.TS]	2,88	1,36	62
C	[% i.TS]	34,49	-	-
N	[% i.TS]	5,83	-	-
S	[% i.TS]	1,87	-	-
C/N	-	6	-	-

Faulschlamm 10		Faulschlamm Substrat	Faulschlamm Gärprodukt	Abbaugrad [%]
pH-Wert	-	7,26	7,46	-

Tab. 8-27: Analysenergebnisse sowie Abbaugrade ausgewählter Inhaltsstoffe des zum Batch-Gärtest der während der Silierung unbehandelten und enzymatisch behandelten Roggensilagen des Erntejahres 2007 verwendeten Faulschlamm

Faulschlamm 11		Faulschlamm Substrat	Faulschlamm Gärprodukt	Abbaugrad [%]
TS	[%]	4,00	2,91	28
oTS	[% i.TS]	66,19	57,97	37
XA	[% i.TS]	45,18	44,76	28
XP	[% i.TS]	39,75	30,14	45
XL	[% i.TS]	2,71	1,62	57
XF	[% i.TS]	8,42	8,41	28
NDF	[% i.TS]	9,93	13,57	1
ADF	[% i.TS]	9,37	10,63	18
ADL	[% i.TS]	5,69	6,65	16
Cellulose	[% i.TS]	3,68	3,98	22
Hemicellulose	[% i.TS]	0,56	2,95	0
WSC	[% i.TS]	0,10	0,15	0
NO ₃	[% i.TS]	0	0	0
NH ₄ -N	[% i.TS]	2,75	1,37	64
C	[% i.TS]	35,70	-	-
N	[% i.TS]	5,94	-	-
S	[% i.TS]	1,92	-	-
C/N	-	6	-	-
pH-Wert	-	7,38	7,70	-

Tab. 8-28: Analysenergebnisse des in den Versuchen zur Vergärung von unbehandelten und enzymatisch behandelten Roggensilagen in unterschiedlichen Gärtests in Kooperation mit der Universität Hohenheim verwendeten Faulschlamm

Faulschlamm 12		Faulschlamm Substrat	Faulschlamm Gärprodukt	Abbaugrad [%]
TS	[%]	4,27	-	-
oTS	[% i.TS]	46,06	-	-
XA	[% i.TS]	53,03	-	-
XP	[% i.TS]	26,93	-	-
XL	[% i.TS]	1,44	-	-
XF	[% i.TS]	7,07	-	-
NDF	[% i.TS]	10,26	-	-
ADF	[% i.TS]	11,41	-	-
ADL	[% i.TS]	7,24	-	-
Cellulose	[% i.TS]	4,18	-	-
Hemicellulose	[% i.TS]	0	-	-
WSC	[% i.TS]	0,15	-	-
NO ₃	[% i.TS]	0	-	-
NH ₄ -N	[% i.TS]	1,00	-	-

Faulschlamm 12		Faulschlamm Substrat	Faulschlamm Gärprodukt	Abbaugrad [%]
C	[% i.TS]	31,33	-	-
N	[% i.TS]	4,96	-	-
S	[% i.TS]	2,36	-	-
C/N	-	6	-	-
pH-Wert	-	7,80	-	-

Tab. 8-29: Analysenergebnisse sowie Abbaugrade ausgewählter Inhaltsstoffe des zum Batch-Gärtest der direkt vor der Silierung unbehandelten und enzymatisch behandelten Roggensilagen des Erntejahres 2007 verwendeten Faulschlamm

Faulschlamm 13		Faulschlamm Substrat	Faulschlamm Gärprodukt	Abbaugrad [%]
TS	[%]	2,99	2,34	22
oTS	[% i.TS]	64,60	60,87	27
XA	[% i.TS]	39,87	41,78	18
XP	[% i.TS]	36,17	35,61	23
XL	[% i.TS]	1,01	-	-
XF	[% i.TS]	12,16	7,73	51
NDF	[% i.TS]	8,95	-	-
ADF	[% i.TS]	6,22	7,09	11
ADL	[% i.TS]	3,98	5,53	0
Cellulose	[% i.TS]	2,24	1,56	46
Hemicellulose	[% i.TS]	2,73	-	-
WSC	[% i.TS]	0,19	-	-
NO ₃	[% i.TS]	< 0,2	0,04	-
NH ₄ -N	[% i.TS]	2,22	1,80	37
C	[% i.TS]	35,65	-	-
N	[% i.TS]	6,76	-	-
S	[% i.TS]	1,94	-	-
C/N	-	5	-	-
pH-Wert	-	7,07	7,23	-

8.2.2 Flüchtige Bestandteile

Tab. 8-30: Gehalt an flüchtigen Bestandteilen der während der Silierung unbehandelten und enzymatisch behandelten Maissilagen von 2005 mit variierenden Häcksellängen

165 d	MiS	ES	PS	BS _{ges}	GS	GA	NH ₃
[%]							
Maissilage 4 mm	1,63	0,48	0,04	0,004	2,16	0,30	0,04
Maissilage + B3	1,62	0,58	0,009	0,01	2,22	0,56	0,03
Maissilage + B4	1,81	0,54	0,01	0,02	2,37	1,96	0,04
Maissilage + B3/B4	1,85	0,62	0,008	0,01	2,49	1,89	0,03
Maissilage 8 mm	1,73	0,52	0,04	n.n.	2,29	0,15	0,04
Maissilage + B3	1,75	0,60	0,006	n.n.	2,36	0,57	0,03
Maissilage + B4	2,04	0,58	0,01	n.n.	2,63	1,27	0,04
Maissilage + B3/B4	1,99	0,70	0,006	n.n.	2,70	1,36	0,03

B3 = Cellulase, B4 = Pektinase, n.n. = nicht nachweisbar, BS_{ges} = Buttersäure + Valeriansäure, Gesamtsäure (GS) = Milchsäure (MiS), Essigsäure (ES), Propionsäure (PS), iso-Buttersäure, n-Buttersäure (BS = iso/n-Buttersäure), iso-Valeriansäure, n-Valeriansäure, n-Caprinsäure, Gesamtalkohol (GA) = Ethanol, Aceton, Methanol, n-Propanol, 1,2-Propandiol, 2,3-Butandiol, iso-Propanol, 2-Butanol, 1-Butanol

Tab. 8-31: Gehalt an flüchtigen Bestandteilen der während der Silierung unbehandelten und enzymatisch behandelten Maissilagen von 2006 mit variierenden Häcksellängen

105 d	MiS	ES	PS	BS _{ges}	GS	GA	NH ₃
[%]							
Maissilage 4 mm	2,00	0,35	n.n.	n.n.	2,35	0,22	0,03
Maissilage + A3/B4	2,03	0,45	n.n.	n.n.	2,48	1,60	0,02
Maissilage + A3/L	2,00	0,40	n.n.	n.n.	2,40	0,60	0,03
Maissilage + B4/L	2,03	0,37	n.n.	n.n.	2,40	0,63	0,02
Maissilage 8 mm	1,91	0,36	n.n.	n.n.	2,27	0,33	0,03
Maissilage + A3	1,63	0,47	n.n.	n.n.	2,10	1,16	0,02
Maissilage + B4	1,94	0,40	n.n.	n.n.	2,34	0,25	0,02
Maissilage + L	1,96	0,38	n.n.	n.n.	2,34	0,45	0,03
Maissilage + A3/B4	1,99	0,40	n.n.	n.n.	2,39	0,89	0,02
Maissilage + A3/L	1,98	0,44	n.n.	n.n.	2,42	0,75	0,02
Maissilage + B4/L	2,01	0,39	n.n.	n.n.	2,40	0,07	0,03
Maissilage + A3/B4/L	2,00	0,46	n.n.	n.n.	2,46	0,60	0,02
Mais-Ganzpflanze 4 mm	0,05	0,15	n.n.	n.n.	0,20	n.n.	n.n.
Mais-Ganzpflanze 8 mm	0,04	0,14	n.n.	n.n.	0,18	0,06	n.n.

A3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase, n.n. = nicht nachweisbar, BS_{ges} = Buttersäure + Valeriansäure, Gesamtsäure (GS) = Milchsäure (MiS), Essigsäure (ES), Propionsäure (PS), iso-Buttersäure, n-Buttersäure (BS = iso/n-Buttersäure), iso-Valeriansäure, n-Valeriansäure, n-Caprinsäure, Gesamtalkohol (GA) = Ethanol, Aceton, Methanol, n-Propanol, 1,2-Propandiol, 2,3-Butandiol, iso-Propanol, 2-Butanol, 1-Butanol

Tab. 8-32: Gehalt an flüchtigen Bestandteilen der während der Silierung unbehandelten und enzymatisch behandelten Roggensilagen von 2006 mit variierenden Häcksellängen

91 d	MiS	ES	PS	BS _{ges}	GS	GA	NH ₃
[%]							
Roggensilage 4 mm	1,59	0,45	n.n.	n.n.	2,04	1,78	0,09
Roggensilage + A3/B4	1,58	0,55	n.n.	n.n.	2,13	2,68	0,08
Roggensilage + A3/L	1,64	0,51	n.n.	n.n.	2,15	2,21	0,10
Roggensilage + B4/L	1,49	0,48	n.n.	n.n.	1,97	1,89	0,10
Roggensilage 8 mm	1,43	0,48	n.n.	n.n.	1,91	n.n.	0,10
Roggensilage + A3	1,42	0,52	n.n.	n.n.	1,94	n.n.	0,10
Roggensilage + B4	1,45	0,48	n.n.	n.n.	1,93	0,11	0,12
Roggensilage + L	1,46	0,47	n.n.	n.n.	1,93	0,10	0,11
Roggensilage + A3/B4	1,41	0,56	n.n.	n.n.	1,97	0,10	0,10
Roggensilage + A3/L	1,36	0,56	n.n.	n.n.	1,92	0,10	0,10
Roggensilage + B4/L	1,39	0,65	n.n.	n.n.	2,04	n.n.	0,10
Roggensilage + A3/B4/L	1,46	0,84	n.n.	n.n.	2,30	n.n.	0,09
Roggen-Ganzpflanze 4 mm	0,19	n.n.	n.n.	n.n.	0,19	n.n.	0,02
Roggen-Ganzpflanze 8 mm	0,11	n.n.	n.n.	n.n.	0,11	n.n.	0,03

A3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase n.n. = nicht nachweisbar, BS_{ges} = Buttersäure + Valeriansäure, Gesamtsäure (GS) = Milchsäure (MiS), Essigsäure (ES), Propionsäure (PS), iso-Buttersäure, n-Buttersäure (BS = iso/n-Buttersäure), iso-Valeriansäure, n-Valeriansäure, n-Caprionsäure, Gesamtalkohol (GA) = Ethanol, Aceton, Methanol, n-Propanol, 1,2-Propandiol, 2,3-Butandiol, iso-Propanol, 2-Butanol, 1-Butanol

Tab. 8-33: Gehalt an flüchtigen Bestandteilen der während der Silierung unbehandelten und enzymatisch behandelten Roggensilagen von 2007 mit einer Häcksellänge von 8 mm

89 d	MiS	ES	PS	BS _{ges}	GS	GA	NH ₃
[%]							
Roggensilage 8 mm	1,92	0,32	n.n.	n.n.	2,24	0,15	0,06
Roggensilage + B4/L-1	1,97	0,31	n.n.	n.n.	2,28	0,27	0,06
Roggensilage + A3/B4-1	2,05	0,35	n.n.	n.n.	2,40	0,39	0,05
Roggensilage + A3/B4/L-1	2,05	0,33	n.n.	n.n.	2,38	0,45	0,06
Roggensilage + B4/L-2	2,09	0,32	n.n.	n.n.	2,41	0,34	0,06
Roggensilage + A3/B4-2	2,01	0,34	n.n.	n.n.	2,35	0,64	0,06
Roggensilage + A3/B4/L-2	2,19	0,35	n.n.	n.n.	2,54	0,63	0,06
Roggensilage + ST-1	2,10	0,33	n.n.	n.n.	2,43	0,32	0,07
Roggensilage + AS-1	2,10	0,33	n.n.	n.n.	2,43	0,30	0,07
Roggen-Ganzpflanze 8 mm	0,11	0,05	n.n.	n.n.	0,16	n.n.	0,02
Shiitake (Häcksel)	0,69	n.n.	n.n.	n.n.	0,69	0,03	0,03
Austernseitling (Häcksel)	0,03	0,12	n.n.	n.n.	0,15	0,03	0,29

A3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase, ST-1 = Shiitake (1. Charge), AS-1 = Austernseitling (1. Charge), Enzym-1 = 0,07 g Enzym/kg Roggen, Enzym-2 = 0,14 g Enzym/kg Roggen, n.n. = nicht nachweisbar, BS_{ges} = Buttersäure + Valeriansäure, Gesamtsäure (GS) = Milchsäure (MiS), Essigsäure (ES), Propionsäure (PS), iso-Buttersäure, n-Buttersäure (BS = iso/n-Buttersäure), iso-Valeriansäure, n-Valeriansäure, n-Caprionsäure, Gesamtalkohol (GA) = Ethanol, Aceton, Methanol, n-Propanol, 1,2-Propandiol, 2,3-Butandiol, iso-Propanol, 2-Butanol, 1-Butanol

Tab. 8-34: Gehalt an flüchtigen Bestandteilen der direkt vor dem Biogasprozess unbehandelten und enzymatisch behandelten Roggensilagen von 2007 mit einer Häcksellänge von 8 mm

24 h	MiS	ES	PS	BS _{ges}	GS	GA	NH ₃
[%]							
Roggensilage 8 mm	1,09	0,58	n.n.	n.n.	1,67	0,44	0,07
Roggensilage + P	1,58	0,56	n.n.	n.n.	2,14	0,40	0,07
Roggensilage + W	0,72	0,29	n.n.	n.n.	1,01	0,18	0,03
Roggensilage + E	1,70	0,59	n.n.	n.n.	2,29	0,38	0,07
Roggensilage + P/W	0,56	0,27	n.n.	n.n.	0,83	0,20	0,03
Roggensilage + P/E	1,62	0,59	n.n.	n.n.	2,21	0,39	0,07
Roggensilage + W/E	0,83	0,30	n.n.	n.n.	1,13	0,18	0,04
Roggensilage + P/W/E	0,88	0,30	n.n.	n.n.	1,18	0,18	0,04

P = Pasteurisieren: 90 °C, 1 bar, 20 Minuten; E = Enzym: A3 + B4, 1 kg je Enzym/t TS Roggen; W = Wasser: 350 g Silage + 350 g Wasser; n.n. = nicht nachweisbar, BS_{ges} = Buttersäure + Valeriansäure, Gesamtsäure (GS) = Milchsäure (MiS), Essigsäure (ES), Propionsäure (PS), iso-Buttersäure, n-Buttersäure (BS = iso/n-Buttersäure), iso-Valeriansäure, n-Valeriansäure, n-Caprionsäure, Gesamtalkohol (GA) = Ethanol, Aceton, Methanol, n-Propanol, 1,2-Propandiol, 2,3-Butandiol, iso-Propanol, 2-Butanol, 1-Butanol

8.2.3 Analytik von flüchtigen Bestandteilen

Im Folgenden wird ein Beispielchromatogramm der Kalibrierlösung von den in dieser Arbeit mit der GC/FID analysierten flüchtigen Fettsäuren und Alkoholen dargestellt.

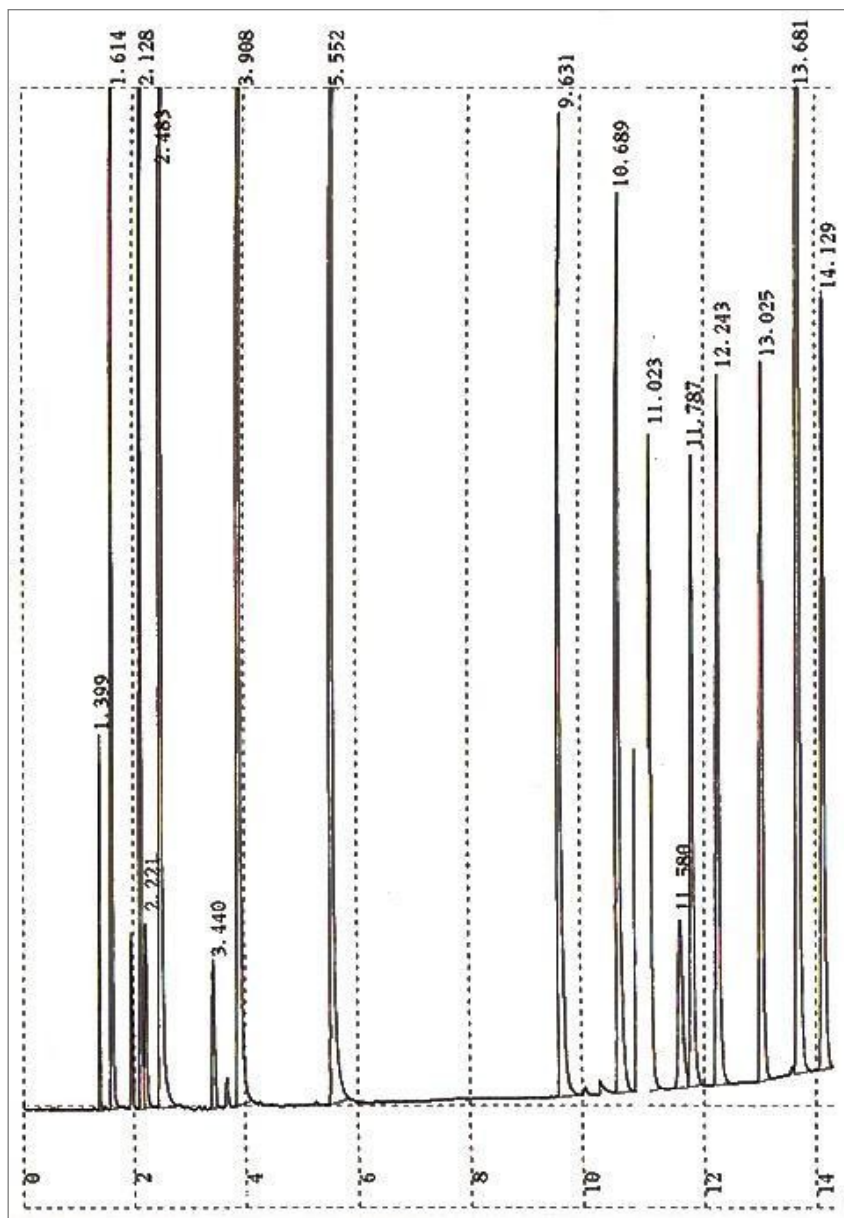


Abb. 8-1: Detektierbare organische Säuren und Alkohole

Elutionsreihenfolge [Minute - Molekül]:

1,614 - Aceton	11,580 - 1,2-Propandiol
2,128 - Methanol	11,787 - n-Buttersäure
2,483 - Ethanol	12,243 - iso-Valeriansäure
3,908 - n-Propanol	13,025 - n-Valeriansäure
5,552 - n-Butanol	13,681 - iso-Caprionsäure
9,631 - Essigsäure	14,129 - n-Caprionsäure
10,689 - Propionsäure	
11,023 - iso-Buttersäure	

8.3 Massen- und Gärverluste

Tab. 8-35: Massen- und Gärverluste (Mittelwert \pm Standardabweichung), M_v und G_v , der während der Silierung unbehandelten und enzymatisch behandelten Maissilagen von 2005 mit variierenden Häcksellängen nach 109 Tagen der Silierung

	n	M_v	G_v
		[g/kg FM]	[%]
Maissilage 4 mm	2	7,7 \pm 0,05	4,7 \pm 0,02
Maissilage + B3	2	7,9 \pm 3,10	5,0 \pm 0,98
Maissilage + B4	2	17,4 \pm 1,41	8,6 \pm 0,50
Maissilage + B3/B4	2	17,7 \pm 1,85	8,8 \pm 0,66
Maissilage 8 mm	2	9,1 \pm 0,31	4,9 \pm 0,08
Maissilage + B3	2	4,0 \pm 1,05	3,7 \pm 0,32
Maissilage + B4	2	10,9 \pm 0,31	5,7 \pm 0,09
Maissilage + B3/B4	2	12,1 \pm 1,11	6,3 \pm 0,35

B3 = Cellulase, B4 = Pektinase

Tab. 8-36: Massen- und Gärverluste (Mittelwert \pm Standardabweichung), M_v und G_v , der während der Silierung unbehandelten und enzymatisch behandelten Maissilagen von 2006 mit variierenden Häcksellängen nach 105 Tagen der Silierung

	n	M_v	G_v
		[g/kg FM]	[%]
Maissilage 4 mm	25	4,2 \pm 0,64	3,6 \pm 0,16
Maissilage + A3/B4	6	12,1 \pm 0,32	5,7 \pm 0,09
Maissilage + A3/L	6	10,9 \pm 0,49	5,3 \pm 0,13
Maissilage + B4/L	6	5,1 \pm 0,51	3,8 \pm 0,13
Maissilage 8 mm	44	4,0 \pm 1,35	3,6 \pm 0,37
Maissilage + A3	5	9,0 \pm 1,51	5,1 \pm 0,48
Maissilage + B4	6	3,8 \pm 0,41	3,6 \pm 0,12
Maissilage + L	6	4,3 \pm 0,85	3,7 \pm 0,25
Maissilage + A3/B4	6	9,3 \pm 1,16	5,2 \pm 0,34
Maissilage + A3/L	5	6,9 \pm 0,64	4,5 \pm 0,19
Maissilage + B4/L	6	3,3 \pm 0,31	3,4 \pm 0,09
Maissilage + A3/B4/L	6	7,1 \pm 1,00	4,6 \pm 0,29

A3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase

Tab. 8-37: Massen- und Gärverluste (Mittelwert \pm Standardabweichung), M_v und G_v , sowie Hefeanzahl der während der Silierung unbehandelten und enzymatisch behandelten Maissilagen von 2006 mit variierenden Häcksellängen für die Lagerung von Tag 105 bis 371

	n	M_v	G_v	Hefeanzahl
		[g/kg FM]	[%]	[KBE/ml FM]
Maissilage 4 mm	21	$1,7 \pm 0,40$	$2,9 \pm 0,10$	$<10^2$
Maissilage + A3/B4	3	$9,4 \pm 1,57$	$5,1 \pm 0,43$	10^4
Maissilage + A3/L	3	$6,1 \pm 0,37$	$4,1 \pm 0,10$	10^3
Maissilage + B4/L	3	$3,5 \pm 1,03$	$3,4 \pm 0,27$	10^3
Maissilage 8 mm	31	$2,0 \pm 0,66$	$3,0 \pm 1,89$	10^3
Maissilage + A3	3	$9,3 \pm 0,76$	$5,2 \pm 0,28$	10^4
Maissilage + B4	2	$3,1 \pm 0,23$	$3,4 \pm 0,07$	10^4
Maissilage + L	1	$2,1 \pm 0$	$3,1 \pm 0$	$<10^2$
Maissilage + A3/B4	3	$11,2 \pm 0,95$	$6,1 \pm 0,31$	10^4
Maissilage + A3/L	3	$7,5 \pm 0,15$	$4,8 \pm 0,05$	10^3
Maissilage + B4/L	3	$2,4 \pm 0,15$	$3,2 \pm 0,04$	10^3
Maissilage + A3/B4/L	3	$7,9 \pm 0,88$	$4,8 \pm 0,26$	10^3

A3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase

Tab. 8-38: Massen- und Gärverluste (Mittelwert \pm Standardabweichung), M_v und G_v , der während der Silierung unbehandelten und enzymatisch behandelten Roggensilagen von 2006 mit variierenden Häcksellängen nach 91 Tagen der Silierung

	n	M_v	G_v
		[g/kg FM]	[%]
Roggensilage 4 mm	8	$11,0 \pm 0,75$	$5,0 \pm 0,17$
Roggensilage + A3/B4	8	$13,1 \pm 1,83$	$5,6 \pm 0,43$
Roggensilage + A3/L	8	$12,9 \pm 1,16$	$5,5 \pm 0,27$
Roggensilage + B4/L	8	$11,7 \pm 0,62$	$5,3 \pm 0,15$
Roggensilage 8 mm	8	$2,8 \pm 0,11$	$3,2 \pm 0,02$
Roggensilage + A3	8	$3,2 \pm 0,29$	$3,2 \pm 0,07$
Roggensilage + B4	8	$3,7 \pm 0,66$	$3,4 \pm 0,16$
Roggensilage + L	8	$3,2 \pm 0,60$	$3,3 \pm 0,14$
Roggensilage + A3/B4	8	$2,7 \pm 0,30$	$3,1 \pm 0,07$
Roggensilage + A3/L	8	$2,7 \pm 0,50$	$3,1 \pm 0,12$
Roggensilage + B4/L	8	$3,1 \pm 0,51$	$3,2 \pm 0,12$
Roggensilage + A3/B4/L	8	$3,1 \pm 0,31$	$3,2 \pm 0,07$

A3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase

Tab. 8-39: Massen- und Gärverluste (Mittelwert \pm Standardabweichung), M_V und G_V , sowie Hefeanzahl der während der Silierung unbehandelten und enzymatisch behandelten Roggensilagen von 2006 mit variierenden Häcksellängen für die Lagerung von Tag 91 bis 365

	n	M_V	G_V	Hefeanzahl
		[g/kg FM]	[%]	[KBE/ml FM]
Roggensilage 4 mm	6	$7,2 \pm 0,74$	$4,2 \pm 0,17$	10^3
Roggensilage + A3/B4	6	$8,5 \pm 0,67$	$4,6 \pm 0,16$	10^3
Roggensilage + A3/L	6	$8,1 \pm 0,35$	$4,5 \pm 0,08$	10^3
Roggensilage + B4/L	6	$7,2 \pm 0,47$	$4,3 \pm 0,11$	10^3
Roggensilage 8 mm	6	$0,6 \pm 0,14$	$2,6 \pm 0,03$	10^4
Roggensilage + A3	6	$0,7 \pm 0,77$	$2,7 \pm 0,18$	10^3
Roggensilage + B4	6	$0,5 \pm 0,29$	$2,6 \pm 0,07$	10^3
Roggensilage + L	6	$1,0 \pm 1,10$	$2,7 \pm 0,26$	10^2
Roggensilage + A3/B4	6	$0,6 \pm 0,10$	$2,7 \pm 0,02$	10^4
Roggensilage + A3/L	6	$0,6 \pm 0,11$	$2,6 \pm 0,03$	10^3
Roggensilage + B4/L	6	$0,8 \pm 0,65$	$2,7 \pm 0,16$	10^4
Roggensilage + A3/B4/L	6	$0,6 \pm 0,23$	$2,6 \pm 0,05$	10^3

A3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase

Tab. 8-40: Massen- und Gärverluste (Mittelwert \pm Standardabweichung), M_V und G_V , der während der Silierung unbehandelten und enzymatisch behandelten Roggensilagen von 2007 mit einer Häcksellänge von 8 mm nach 89 Tagen der Silierung

	n	M_V	G_V
		[g/kg FM]	[%]
Roggensilage 8 mm	15	$8,2 \pm 1,05$	$4,7 \pm 0,29$
Roggensilage + B4/L -1	6	$9,4 \pm 0,81$	$5,1 \pm 0,22$
Roggensilage + A3/B4-1	6	$10,2 \pm 1,64$	$5,4 \pm 0,46$
Roggensilage + A3/B4/L-1	6	$11,8 \pm 1,13$	$5,8 \pm 0,32$
Roggensilage + B4/L-2	6	$10,3 \pm 0,64$	$5,4 \pm 0,18$
Roggensilage + A3/B4-2	6	$15,2 \pm 1,12$	$6,8 \pm 0,32$
Roggensilage + A3/B4/L-2	6	$13,5 \pm 0,61$	$6,3 \pm 0,17$
Roggensilage + ST-1	6	$10,1 \pm 0,63$	$5,2 \pm 0,17$
Roggensilage + AS-1	6	$10,0 \pm 1,04$	$5,2 \pm 0,28$

A3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase, ST-1 = Shiitake (1. Charge), AS-1 = Austernseitling (1. Charge), Enzym-1 = 0,07 g Enzym/kg Roggen, Enzym-2 = 0,14 g Enzym/kg Roggen

Tab. 8-41: Massen- und Gärverluste (Mittelwert \pm Standardabweichung), M_v und G_v , der während der Silierung unbehandelten und enzymatisch behandelten Roggensilagen von 2007 mit einer Häcksellänge von 8 mm für die Lagerung von Tag 89 bis 367

	n	M_v	G_v
		[g/kg FM]	[%]
Roggensilage 8 mm	1	2,2 \pm 0	3,1 \pm 0
Roggensilage + B4/L -1	3	2,5 \pm 0,12	3,2 \pm 0,03
Roggensilage + A3/B4-1	3	5,1 \pm 1,10	4,0 \pm 0,33
Roggensilage + A3/B4/L-1	2	3,0 \pm 0,52	3,4 \pm 0,15
Roggensilage + B4/L-2	3	3,5 \pm 0,33	3,5 \pm 0,09
Roggensilage + A3/B4-2	3	4,7 \pm 0,50	3,9 \pm 0,15
Roggensilage + A3/B4/L-2	3	6,2 \pm 1,79	4,3 \pm 0,52
Roggensilage + ST-1	3	3,4 \pm 0,64	3,5 \pm 0,18
Roggensilage + AS-1	3	2,7 \pm 0,73	3,2 \pm 0,20

A3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase, ST-1 = Shiitake (1. Charge), AS-1 = Austernseitling (1. Charge), Enzym-1 = 0,07 g Enzym/kg Roggen, Enzym-2 = 0,14 g Enzym/kg Roggen

8.4 Biogassummenkurven

Nachfolgend sind die Biogassummenkurven der eingesetzten Substrate, Faulschlamm und Referenzmaterialien dargestellt. Dabei handelt es sich um reduzierte Biogaswerte hinsichtlich der Substrate, das heißt, die dargestellten normierten Werte beziehen sich ausschließlich auf das Substrat. Aufgetragen wurden gemittelte Biogaswerte ($n = 2$ oder 3).

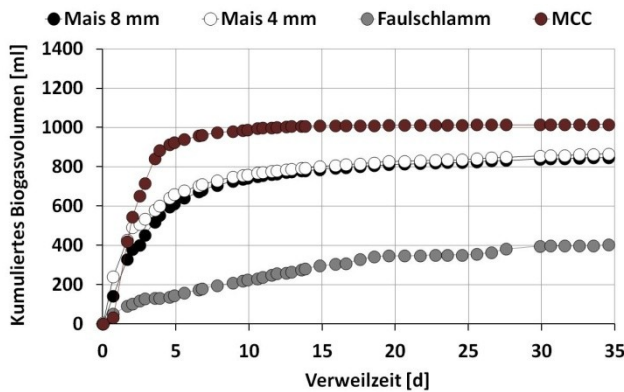


Abb. 8-2: Biogassummenkurven der Maisvarianten des Erntejahres 2005, dem verwendeten Faulschlamm und des Referenzmaterials (MCC - Mikrokristalline Cellulose)

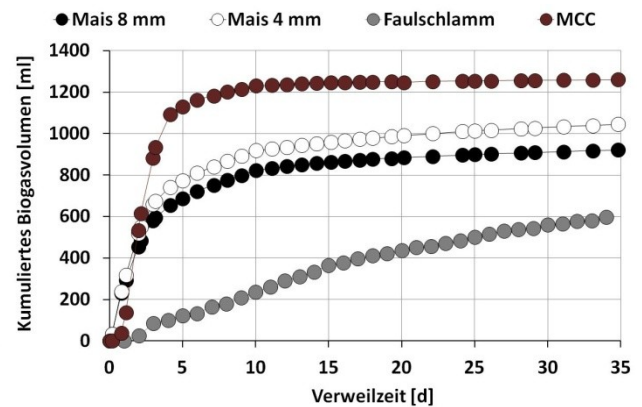


Abb. 8-3: Biogassummenkurven der Maisvarianten des Erntejahres 2006, dem verwendeten Faulschlamm und des Referenzmaterials (MCC - Mikrokristalline Cellulose)

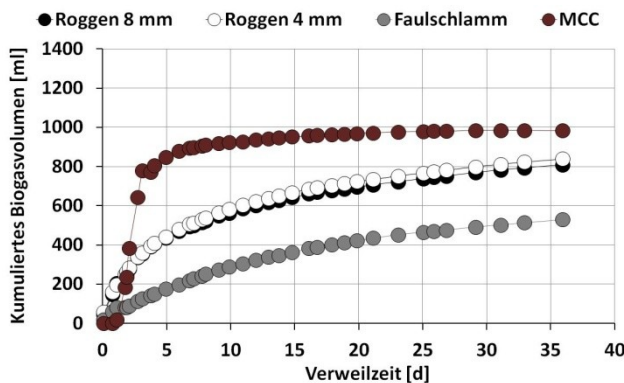


Abb. 8-4: Biogassummenkurven der Roggenvarianten des Erntejahres 2006, dem verwendeten Faulschlamm und des Referenzmaterials (MCC = Mikrokristalline Cellulose)

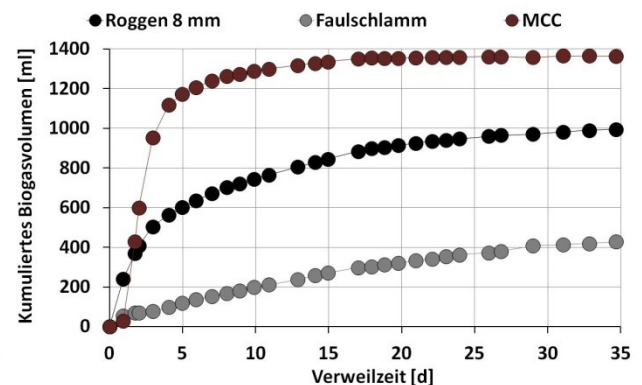


Abb. 8-5: Biogassummenkurven der Roggenvarianten des Erntejahres 2007, dem verwendeten Faulschlamm und des Referenzmaterials (MCC = Mikrokristalline Cellulose)

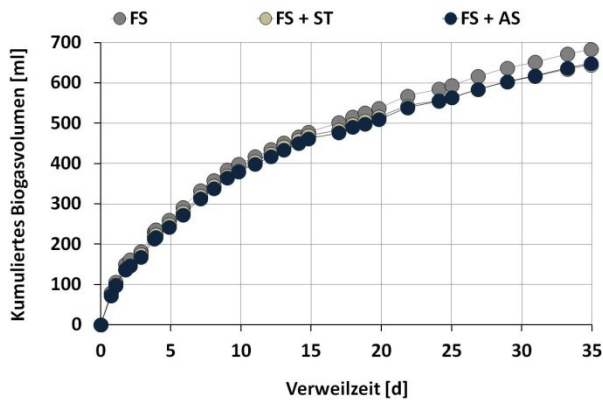


Abb. 8-6: Biogassummenkurven des Faulschlammes ohne und mit Zusatz eines Pilzsubstrates (FS = Faulschlamm, ST-2 = Shiitake (2. Charge), AS-2 = Austerseitling (2. Charge))

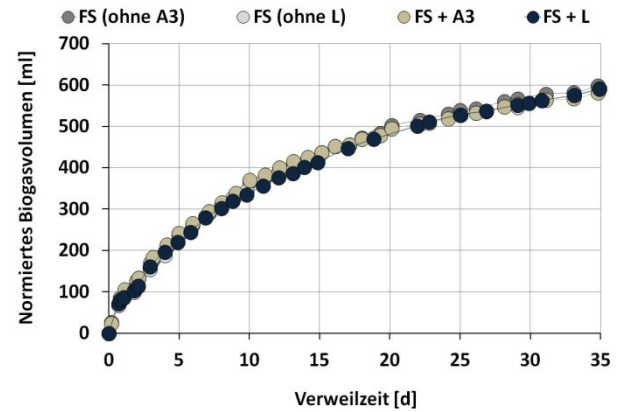


Abb. 8-7: Biogassummenkurven der Faulschlämme ohne und mit Zusatz von Enzympräparaten (FS = Faulschlamm, A3 = Cellulase, L = Laccase)

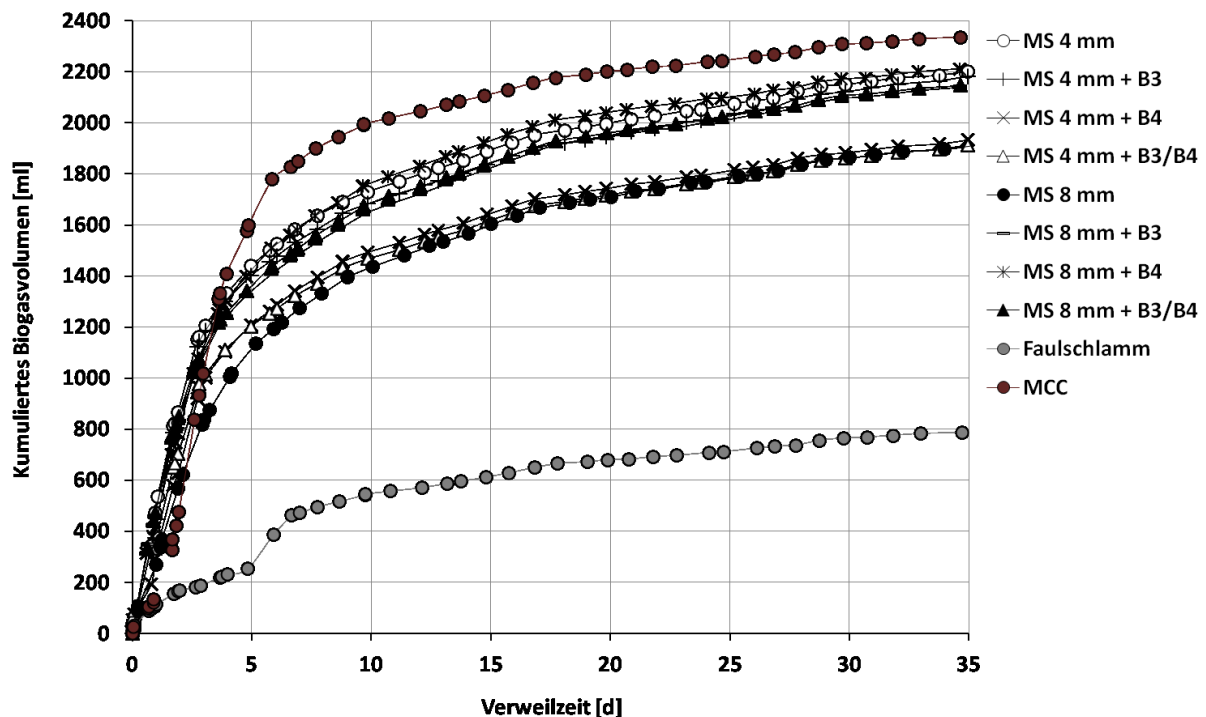


Abb. 8-8: Biogassummenkurven der während der Silierung unbehandelten und enzymatisch behandelten Maissilagen des Erntejahres 2005 mit variierender Häcksellänge (nicht reduzierte Werte, MS = Maissilage, B3 = Cellulase, B4 = Pektinase, MCC = MikrokristallineCellulose)

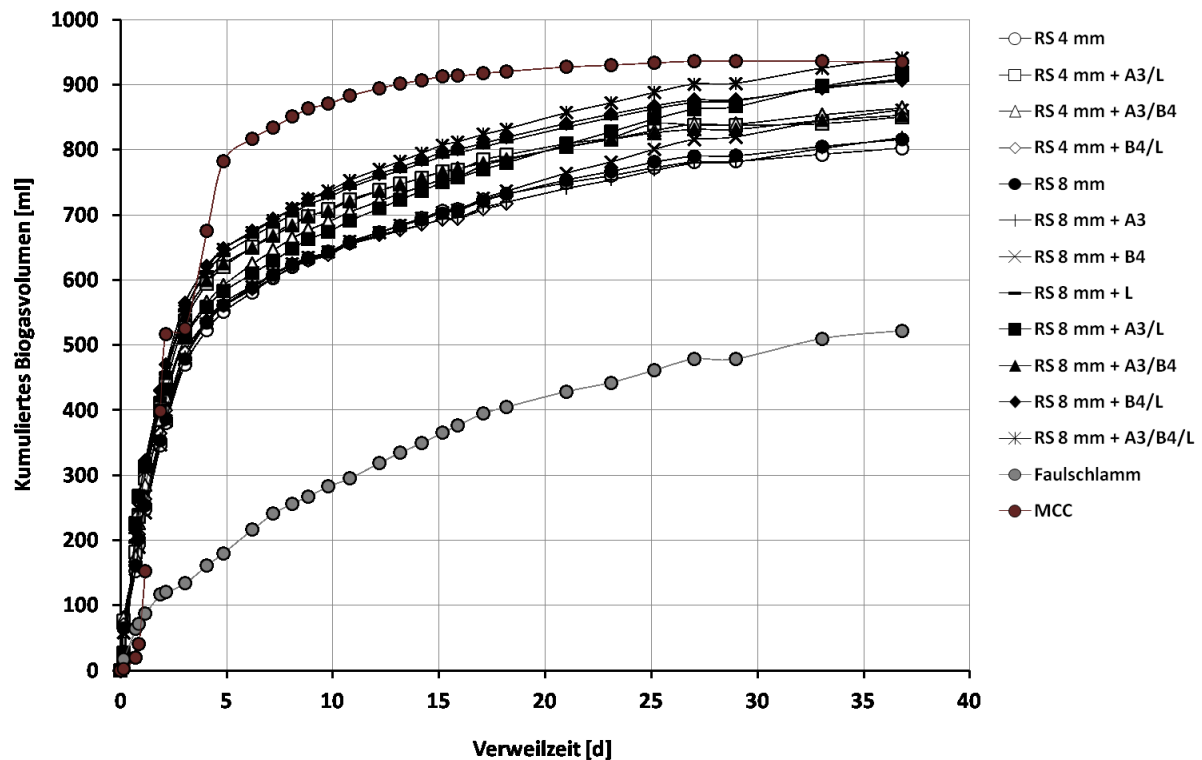


Abb. 8-9: Biogasummenkurven der während der Silierung unbehandelten und enzymatisch behandelten Roggensilagen des Erntejahres 2006 mit variierender Hackzellänge (RS = Roggensilage, A3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase, MCC = Mikrokristalline Cellulose)

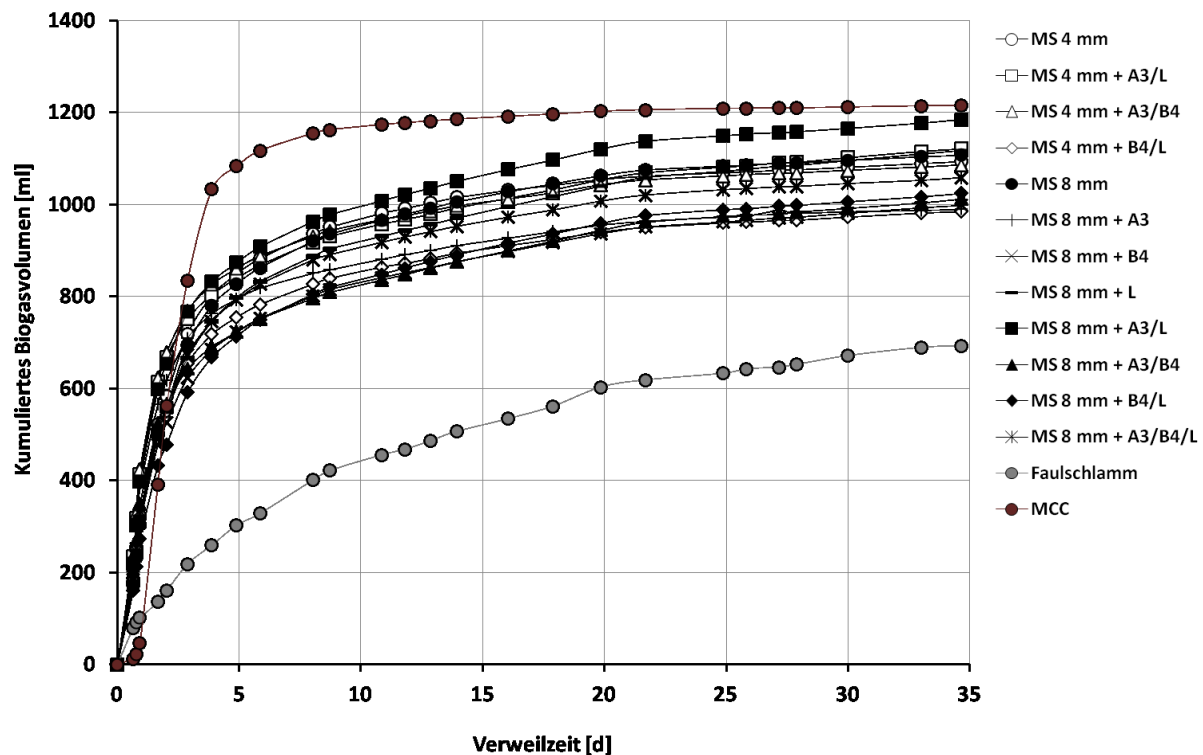


Abb. 8-10: Biogasummenkurven der während der Silierung unbehandelten und enzymatisch behandelten Maissilagen des Erntejahres 2006 mit variierender Hackzellänge (MS = Maissilage, A3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase, MCC = Mikrokristalline Cellulose)

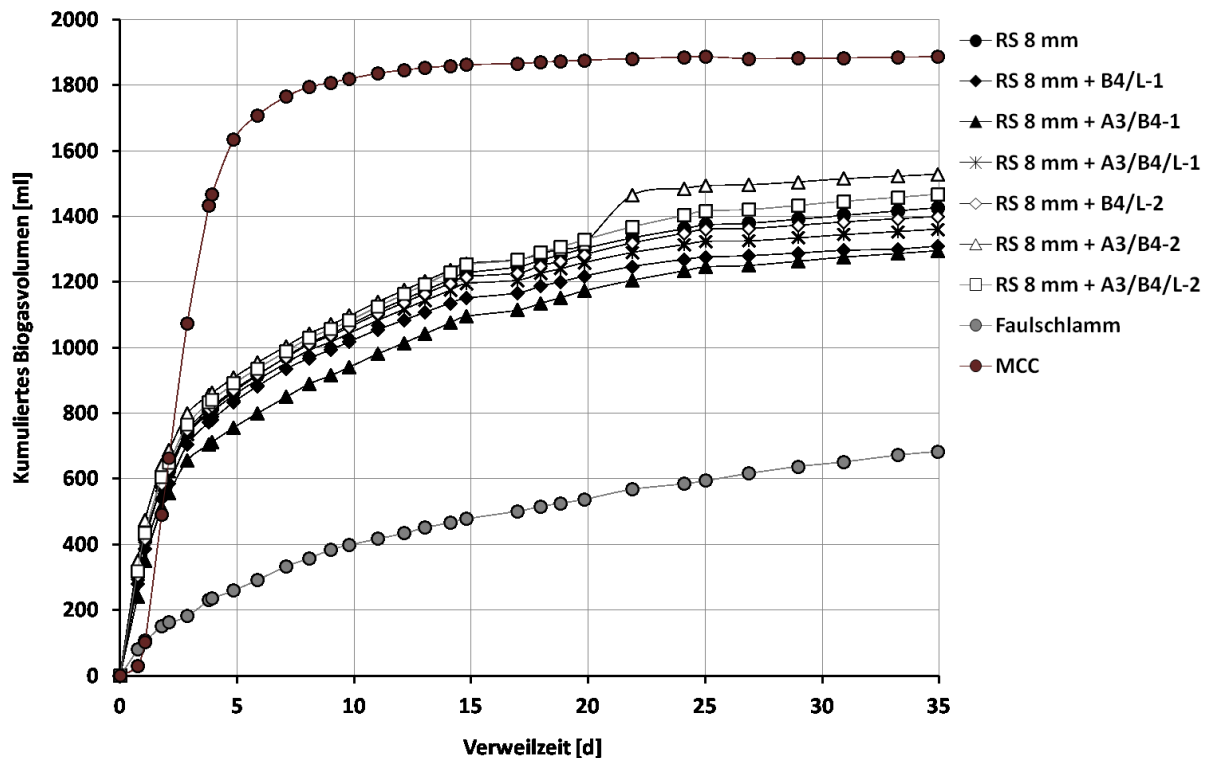


Abb. 8-11: Biogassummenkurven der während der Silierung unbehandelten und enzymatisch behandelten Roggensilagen des Erntejahres 2007 mit einer Häcksellänge von 8 mm (RS = Roggensilage, A3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase, MCC = Mikrokristalline Cellulose, Enzym-1 = 0,07 g Enzym/kg Roggen, Enzym-2 = 0,14 g Enzym/kg Roggen)

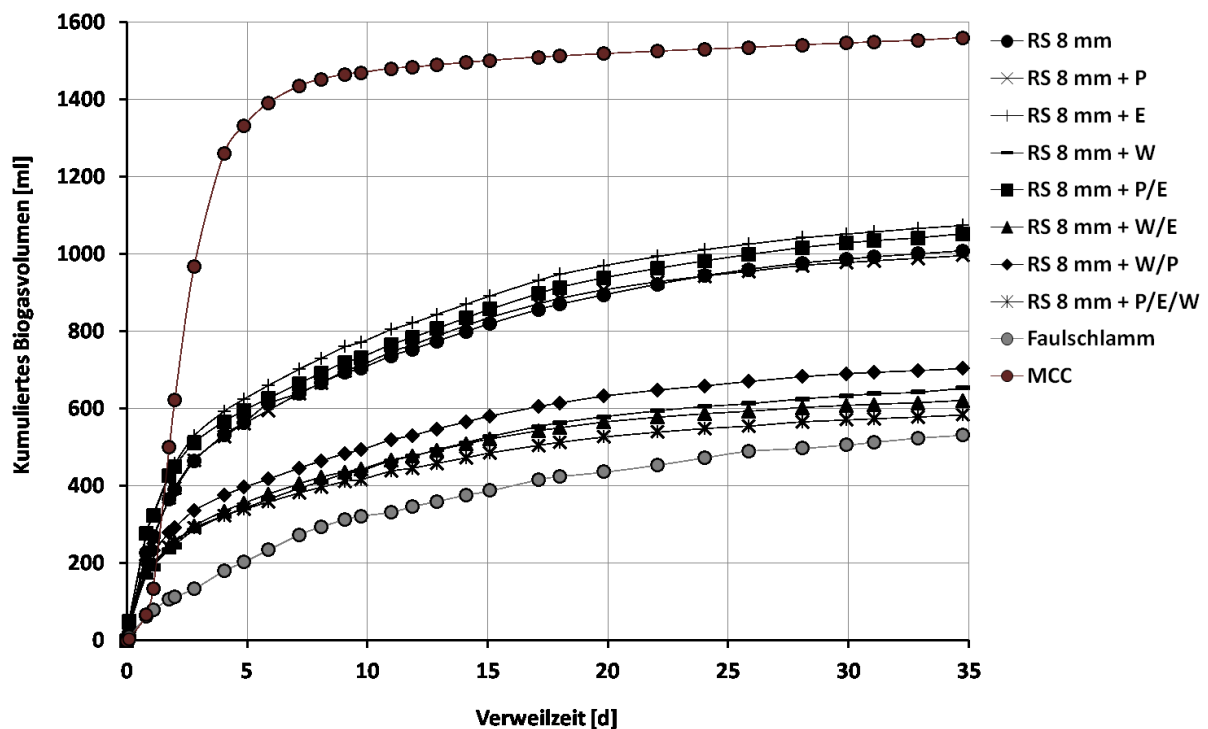


Abb. 8-12: Biogassummenkurven der direkt vor dem Biogasprozess unbehandelten und enzymatisch behandelten Roggensilagen des Erntejahres 2007 mit einer Häcksellänge von 8 mm (RS = Roggensilage, P = Pasteurisieren: 90 °C, 1 bar, 20 Minuten; E = Enzym: A3 + B4, 1 kg je Enzym/t TS Roggen; W = Wasser: 350 g Silage + 350 g Wasser, MCC = Mikrokristalline Cellulose)

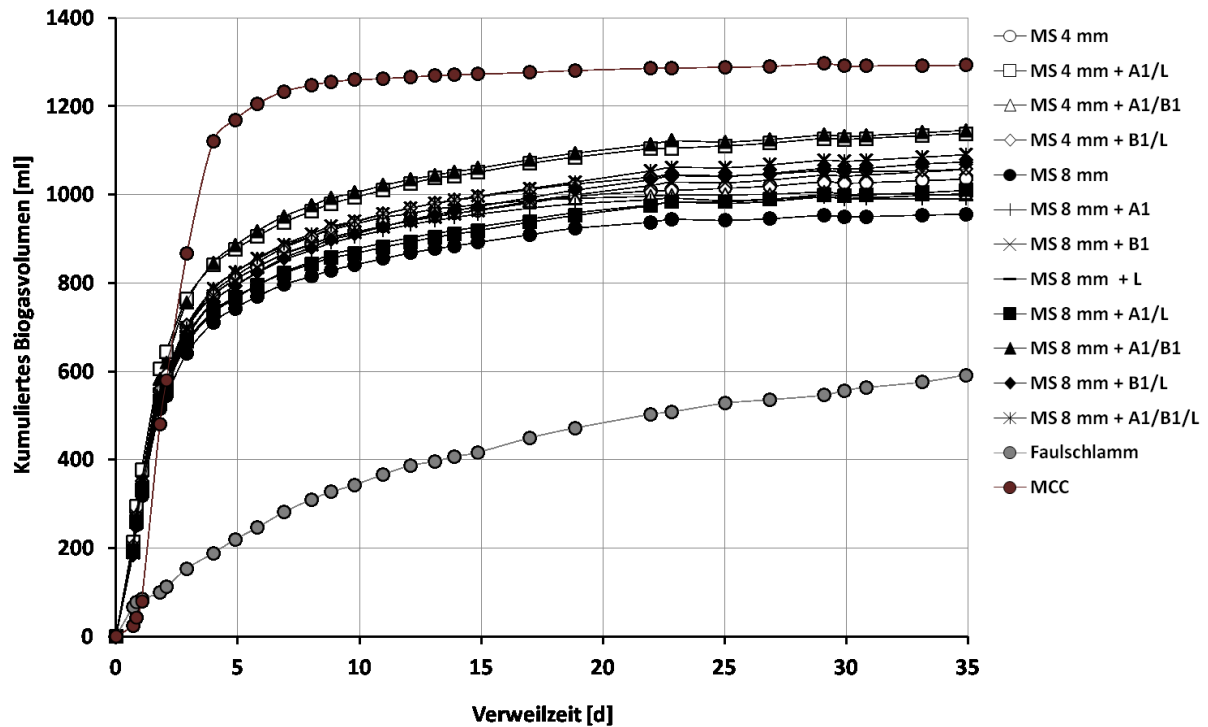


Abb. 8-13: Biogassummenkurven der während des Biogasprozesses unbehandelten und enzymatisch behandelten Maissilagen des Erntejahres 2006 mit einer Hacksellänge von 8 mm (MS = Maissilage, A1 = Cellulase, B1 = Pektinase, L = Laccase, MCC = Mikrokristalline Cellulose)

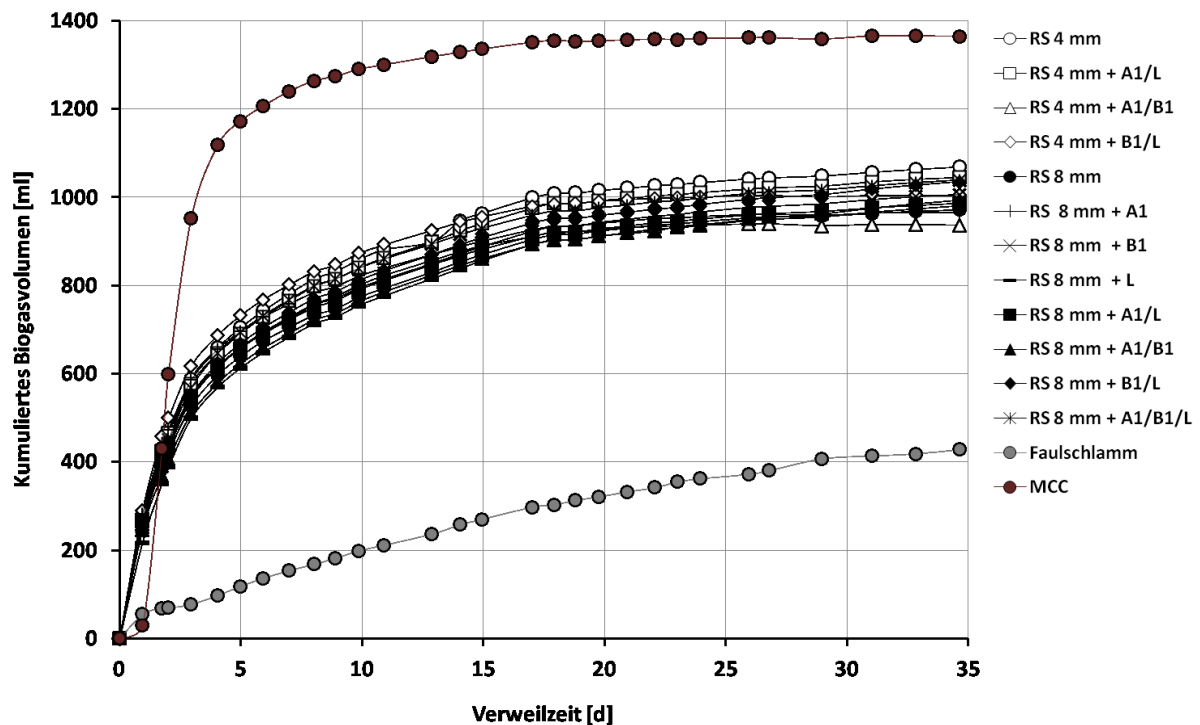


Abb. 8-14: Biogassummenkurven der während des Biogasprozesses unbehandelten und enzymatisch behandelten Roggensilagen des Erntejahres 2006 mit einer Hacksellänge von 8 mm (RS = Roggensilage, A1 = Cellulase, B1 = Pektinase, L = Laccase, MCC = Mikrokristalline Cellulose)

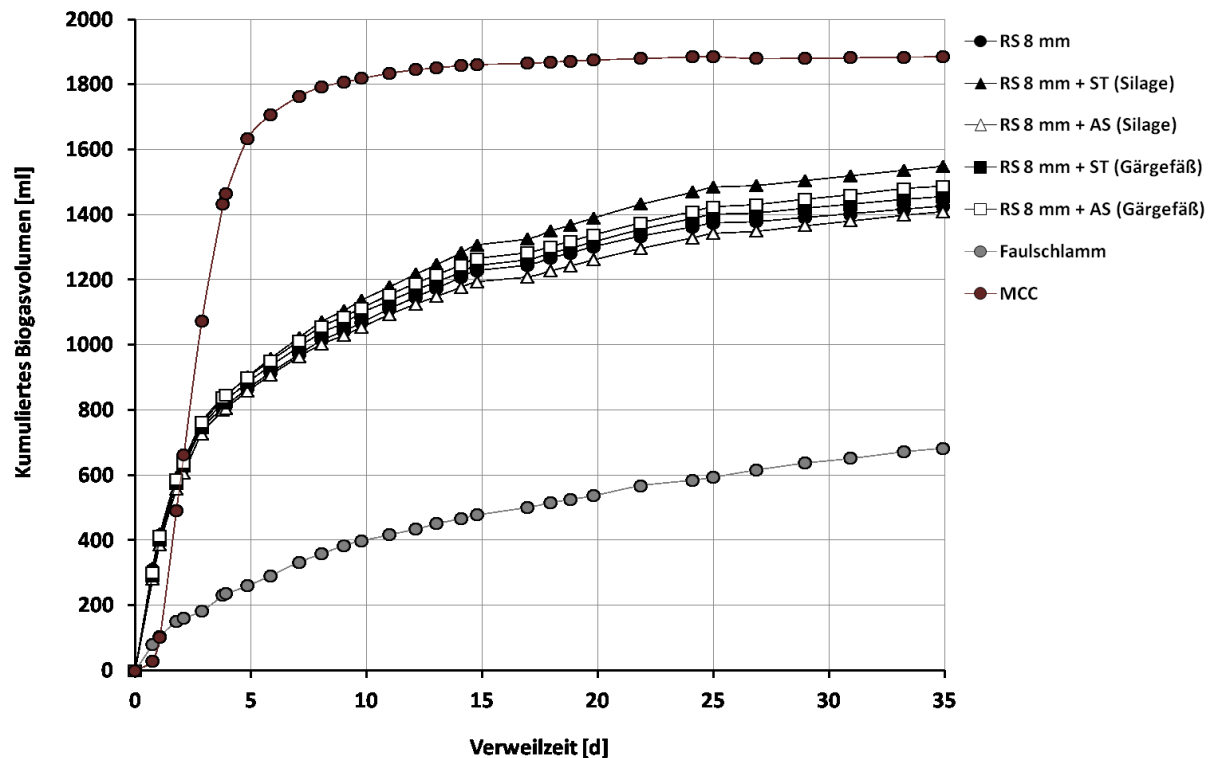


Abb. 8-15: Biogassummenkurven der während der Silierung oder des Biogasprozesses unbehandelten und mit Pilzsubstraten (Häcksel) behandelten Roggensilagen des Erntejahres 2007 mit einer Häcksellänge von 8 mm (RS = Roggensilage, ST = Shiitake, AS = Austernseitling, MCC = Mikrokristalline Cellulose)

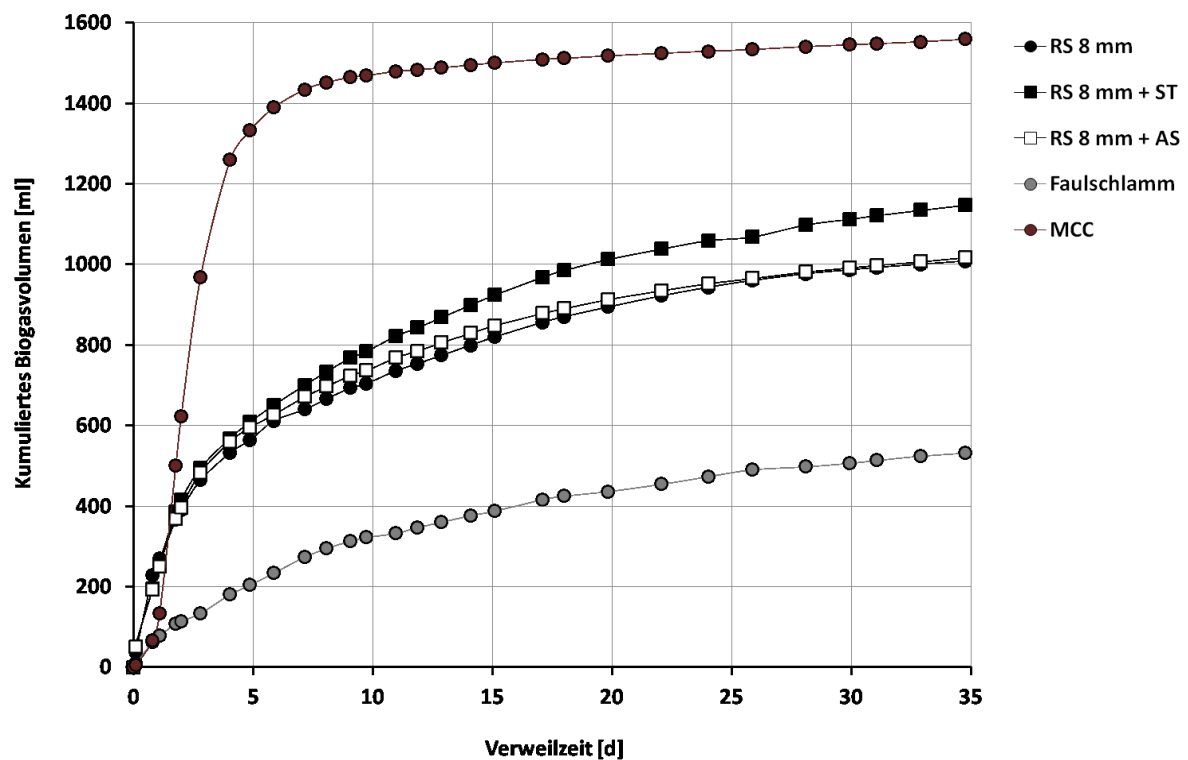


Abb. 8-16: Biogassummenkurven der während des Biogasprozesses unbehandelten und mit Pilzsubstraten (Presssäfte) behandelten Roggensilagen des Erntejahres 2007 mit einer Häcksellänge von 8 mm (RS = Roggensilage, ST = Shiitake, AS = Austernseitling, MCC = Mikrokristalline Cellulose)

8.5 Abbaugrade ausgewählter Inhaltsstoffe

Tab. 8-42: Stoffbilanzierung der Cellulose der während der Silierung unbehandelten und enzymatisch behandelten Silagen unterschiedlicher Erntejahre und Häcksellängen (Mittelwertdarstellung)

Abbaugrad [%]		Abbaugrad [%]	
Erntejahr 2005			
Maissilage 4 mm	70,00	Maissilage 8 mm	64,00
Maissilage + B3	70,88	Maissilage + B3	54,92
Maissilage + B4	67,00	Maissilage + B4	61,00
Maissilage + B3/B4	63,02	Maissilage + B3/B4	60,84
Erntejahr 2006			
Maissilage 4 mm	83,80	Maissilage 8 mm	78,75
Maissilage + A3/B4	88,66	Maissilage + A3	73,02
Maissilage + A3/L	98,42	Maissilage + B4	82,62
Maissilage + B4/L	75,16	Maissilage + L	84,00
		Maissilage + A3/B4	91,86
		Maissilage + A3/L	86,88
		Maissilage + B4/L	88,24
		Maissilage + A3/B4/L	92,90
Roggensilage 4 mm	66,00	Roggensilage 8 mm	46,00
Roggensilage + A3/B4	52,00	Roggensilage + A3	44,00
Roggensilage + A3/L	-	Roggensilage + B4	40,00
Roggensilage + B4/L	-	Roggensilage + L	38,89
		Roggensilage + A3/B4	48,30
		Roggensilage + A3/L	41,00
		Roggensilage + B4/L	61,00
		Roggensilage + A3/B4/L	-
Erntejahr 2007			
		Roggensilage 8 mm	76,50
		Roggensilage + B4/L-1	61,72
		Roggensilage + A3/B4-1	63,51
		Roggensilage + A3/B4/L-1	60,87
		Roggensilage + B4/L-2	81,57
		Roggensilage + A3/B4-2	82,33
		Roggensilage + A3/B4/L-2	82,33
		Roggensilage + ST-1	77,05
		Roggensilage + AS-1	78,88

B3 = Cellulase, A3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase, Enzym-1 = 0,07 g Enzym/kg Roggen, Enzym-2 = 0,14 g Enzym/kg Roggen, ST-1 = Shiitake (1. Charge), AS-1 = Austernseitling (1. Charge)

Tab. 8-43: Stoffbilanzierung der Cellulose der direkt vor dem Biogasprozess unbehandelten und enzymatisch behandelten Roggensilagen von 2007 mit einer Häcksellänge von 8 mm (Mittelwertdarstellung)

	Abbaugrad [%]
Roggensilage 8 mm	72
Roggensilage + P	-
Roggensilage + W	86
Roggensilage + E	72
Roggensilage + P/W	82
Roggensilage + P/E	71
Roggensilage + W/E	91
Roggensilage + P/W/E	88

P = Pasteurisieren: 90 °C, 1 bar, 20 Minuten; E = Enzym: A3 + B4, 1 kg je Enzym/t TS Roggen; W = Wasser: 350 g Silage + 350 g Wasser

8.6 Enzymaktivitäten

Tab. 8-44: Enzymaktivitäten der Enzympräparate (Mittelwerte) gegenüber ausgewählten Modellsubstraten bei einem pH-Wert von 4,5 und einer Temperatur von 30 °C

	a_H [U/g]	s	VarK [%]
<i>Na-Carboxymethylcellulose</i>			
A1 Cellulase	2508	155	6,2
A2 Cellulase	3563	257	7,2
A3 Cellulase	5636	348	6,2
B1 Pektinase	896	79	8,8
B2 Hemicellulase	1029	29	2,9
B3 Cellulase	1308	68	5,2
B4 Pektinase	927	79	8,6
C1 Cellulase	1247	99	7,9
C2 Pektinase	878	68	7,7
Laccase A	-	-	-
Laccase C	1001	88	8,8
<i>Filterpapier</i>			
A1 Cellulase	180	5	2,9
A2 Cellulase	224	7	3,2
A3 Cellulase	331	13	3,9
B1 Pektinase	140	13	8,9
B2 Hemicellulase	127	6	4,7
B3 Cellulase	173	15	8,5
B4 Pektinase	125	9	7,3
C1 Cellulase	135	11	7,8
C2 Pektinase	125	13	10,4
Laccase A	-	-	-
Laccase C	109	8	7,5
<i>Arabinogalactan</i>			
A1 Cellulase	1499	90	6,0
A2 Cellulase	1817	150	8,3
A3 Cellulase	1786	166	9,3
B1 Pektinase	1161	90	7,7
B2 Hemicellulase	1547	103	6,6
B3 Cellulase	1357	49	3,6
B4 Pektinase	1273	87	6,8
C1 Cellulase	1195	68	5,7
C2 Pektinase	1459	127	8,7
Laccase A	-	-	-
Laccase C	0	0	0
<i>Arabinoxylan</i>			
A1 Cellulase	3865	156	4,0
A2 Cellulase	2031	144	7,1
A3 Cellulase	9913	339	3,4
B1 Pektinase	2123	115	5,4
B2 Hemicellulase	1602	40	2,5

	a_H [U/g]	s	VarK [%]
B3 Cellulase	2837	107	3,8
B4 Pektinase	1451	128	8,8
C1 Cellulase	2822	162	5,8
C2 Pektinase	2223	95	4,3
Laccase A	-	-	-
Laccase C	0	0	0
<i>Glucomannan (n= 10)</i>			
A1 Cellulase	898	87	9,7
A2 Cellulase	11.275	436	3,9
A3 Cellulase	2723	44	1,6
B1 Pektinase	860	86	9,9
B2 Hemicellulase	1055	93	8,8
B3 Cellulase	1004	79	7,9
B4 Pektinase	850	71	8,4
C1 Cellulase	1026	48	4,7
C2 Pektinase	898	63	7,0
Laccase A	-	-	-
Laccase C	1050	101	9,6
<i>Pektin</i>			
A1 Cellulase	3637	65	1,8
A2 Cellulase	3715	295	8,0
A3 Cellulase	16.239	710	4,4
B1 Pektinase	5056	415	8,2
B2 Hemicellulase	3355	248	7,4
B3 Cellulase	4165	393	9,4
B4 Pektinase	6292	188	3,0
C1 Cellulase	3811	434	11,4
C2 Pektinase	4609	374	8,1
Laccase A	-	-	-
Laccase C	3185	199	6,3
	a_O [U/ml]	s	VarK [%]
<i>Guaiacol</i>			
Laccase A	2	0,4	15,7
Laccase C	167	6	3,7
<i>2,6-Dimethoxyphenol</i>			
Laccase A	11	0,2	2,1
Laccase C	1328	27	2,0

a_H = Enzymaktivität der Hydrolase, a_O = Enzymaktivität der Oxidoreduktase, s = Standardabweichung, VarK = Variationskoeffizient

Tab. 8-45: Enzymaktivitäten der Enzympräparate gegenüber ausgewählten Modellsubstraten bei einem pH-Wert von 7,5 und einer Temperatur von 38 °C

	a_H [U/g]	s	VarK [%]
<i>Na-Carboxymethylcellulose</i>			
A1 Cellulase	1456	105	7,2
A2 Cellulase	966	88	9,1
A3 Cellulase	1309	103	7,8

	a_H [U/g]	s	VarK [%]
B1 Pektinase	860	85	9,9
B2 Hemicellulase	911	68	7,4
B3 Cellulase	965	96	9,9
B4 Pektinase	727	70	9,7
C1 Cellulase	989	71	7,1
C2 Pektinase	769	73	9,5
Laccase A	-	-	-
Laccase C	0	0	0
<i>Filterpapier</i>			
A1 Cellulase	111	8	6,9
A2 Cellulase	95	4	4,3
A3 Cellulase	105	5	4,9
B1 Pektinase	111	8	6,9
B2 Hemicellulase	102	6	5,7
B3 Cellulase	102	5	4,5
B4 Pektinase	110	7	6,2
C1 Cellulase	108	5	5,1
C2 Pektinase	107	7	6,4
Laccase A	-	-	-
Laccase C	0	0	0
<i>Arabinogalactan</i>			
A1 Cellulase	1607	65	3,9
A2 Cellulase	1706	113	6,6
A3 Cellulase	1641	117	7,1
B1 Pektinase	1699	98	5,8
B2 Hemicellulase	1719	126	7,3
B3 Cellulase	1801	146	8,1
B4 Pektinase	1738	166	9,6
C1 Cellulase	1886	196	10,4
C2 Pektinase	1993	195	9,8
Laccase A	-	-	-
Laccase C	0	0	0
<i>Arabinoxylan</i>			
A1 Cellulase	2578	117	4,5
A2 Cellulase	1239	89	7,2
A3 Cellulase	1522	95	6,2
B1 Pektinase	1406	119	8,5
B2 Hemicellulase	1289	53	4,1
B3 Cellulase	1969	49	2,5
B4 Pektinase	1289	116	9,0
C1 Cellulase	1966	88	4,5
C2 Pektinase	1097	57	5,2
Laccase A	-	-	-
Laccase C	1292	94	7,3
<i>Glucomannan (n= 10)</i>			
A1 Cellulase	1031	70	6,8

	a_H [U/g]	s	VarK [%]
A2 Cellulase	1416	101	7,2
A3 Cellulase	1454	84	5,8
B1 Pektinase	0	0	-
B2 Hemicellulase	947	91	9,6
B3 Cellulase	1194	78	6,5
B4 Pektinase	1057	112	10,6
C1 Cellulase	999	106	10,6
C2 Pektinase	980	89	9,1
Laccase A	-	-	-
Laccase C	938	47	5,0
<i>Pektin</i>			
A1 Cellulase	5783	294	9,8
A2 Cellulase	4980	488	5,1
A3 Cellulase	9283	582	6,3
B1 Pektinase	5019	397	7,9
B2 Hemicellulase	4627	353	7,6
B3 Cellulase	4848	521	10,8
B4 Pektinase	5079	410	8,1
C1 Cellulase	4831	298	6,2
C2 Pektinase	4449	382	8,6
Laccase A	-	-	-
Laccase C	6338	367	5,8
	a_O [U/ml]	s	VarK [%]
<i>Guaiacol</i>			
Laccase A	3	0,6	22,8
Laccase C	17	2	10,1
<i>2,6-Dimethoxyphenol</i>			
Laccase A	197	4	2,2
Laccase C	69	2	2,3

a_H = Enzymaktivität der Hydrolase, a_O = Enzymaktivität der Oxidoreduktase, s = Standardabweichung, VarK = Variationskoeffizient

8.7 Statistische Auswertung

Tab. 8-46: Bestimmtheitsmaße R^2 der polynomen Kurven der einzelnen Verläufe der Massenverluste während der Silierung der Rohstoffe von 2006 und 2007

Variante	R^2	Variante	R^2	Variante	R^2
Erntejahr 2006		Erntejahr 2006		Erntejahr 2007	
Maissilage 4 mm	0,930	Roggensilage 4 mm	0,989	Roggensilage 8 mm	0,817
Maissilage + A3/B4	0,991	Roggensilage + A3/B4	0,993	Roggensilage + B4/L-1	0,843
Maissilage + A3/L	0,980	Roggensilage + A3/L	0,986	Roggensilage + A3/B4-1	0,935
Maissilage + B4/L	0,962	Roggensilage + B4/L	0,987	Roggensilage + A3/B4/L-1	0,889
Maissilage 8 mm	0,906	Roggensilage 8 mm	0,844	Roggensilage + B4/L-2	0,814
Maissilage + A3	0,994	Roggensilage + A3	0,854	Roggensilage + A3/B4-2	0,912
Maissilage + B4	0,957	Roggensilage + B4	0,785	Roggensilage + A3/B4/L-2	0,907
Maissilage + L	0,923	Roggensilage + L	0,886		
Maissilage + A3/B4	0,997	Roggensilage + A3/B4	0,857		
Maissilage + A3/L	0,994	Roggensilage + A3/L	0,811		
Maissilage + B4/L	0,923	Roggensilage + B4/L	0,878		
Maissilage + A3/B4/L	0,994	Roggensilage + A3/B4/L	0,828		

A3 = Cellulase, B4 = Pektinase, L = Laccase, Enzym-1 = 0,07 g Enzym/kg Roggen, Enzym-2 = 0,14 g Enzym/kg Roggen

Tab. 8-47: Zusammenhänge zwischen der Methanausbeute und ausgewählten Inhaltsstoffen der unbehandelten und enzymatisch behandelten Mais- und Roggensilagen der Erntejahre 2005, 2006 und 2007; n = 8 (Maissilagen 2005), n = 12 (Mais- und Roggensilagen 2006), n = 9 (Roggensilagen 2007)

	MiS	ES	GS	GA	WSC	Cellulose	Hemicellulose	Lignin
Enzymatische Behandlung während der Silierung								
Maissilage 2005	0,418 ^{n.s.}	0,352 ^{n.s.}	0,433 ^{n.s.}	-0,402 ^{n.s.}	-0,195 ^{n.s.}	0,477 ^{n.s.}	0,309 ^{n.s.}	0,817 [*]
Maissilage 2006	0,299 ^{n.s.}	-0,315 ^{n.s.}	0,199 ^{n.s.}	-0,145 ^{n.s.}	0,348 ^{n.s.}	0,368 ^{n.s.}	0,413 ^{n.s.}	0,321 ^{n.s.}
Roggensilage 2006	-0,378 ^{n.s.}	0,930 ^{***}	0,563 ^{n.s.}	-0,439 ^{n.s.}	0,263 ^{n.s.}	-0,235 ^{n.s.}	-0,444 ^{n.s.}	-0,135 ^{n.s.}
Roggensilage 2007	0,310 ^{n.s.}	0,318 ^{n.s.}	0,330 ^{n.s.}	0,381 ^{n.s.}	-0,374 ^{n.s.}	0,693 [*]	-0,348 ^{n.s.}	0,717 [*]
Enzymatische Behandlung direkt vor dem Biogasprozess								
Roggensilage 2007	-0,697 ^{n.s.}	-0,773 [*]	-0,730 [*]	-0,768 [*]	0,604 ^{n.s.}	-0,755 [*]	-0,688 ^{n.s.}	-0,756 [*]

n.s. = nicht signifikant, *p<0,05 (Dunnett-Test), ***p>0,001 (Dunnett-Test), Gesamtsäure (GS) = Milchsäure (MiS), Essigsäure (ES), Propionsäure (PS), iso-Buttersäure, n-Buttersäure (BS = iso/n-Buttersäure), iso-Valeriansäure, n-Valeriansäure, n-Caprinsäure, Gesamtalkohol (GA) = Ethanol, Aceton, Methanol, n-Propanol, 1,2-Propandiol, 2,3-Butandiol, iso-Propanol, 2-Butanol, 1-Butanol, WSC = Wasserlösliche Kohlenhydrate, n = Probenanzahl

Tab. 8-48: Zusammenhänge zwischen der Methanausbeute und ausgewählten Inhaltsstoffen bezogen auf die Gesamtsumme an unbehandelten und enzymatisch behandelten, hergestellten Silagen zwischen 2005 und 2007

Silagevarianten 2005-2007	Merkmal	n	Korrelationskoeffizient
	Milchsäure	41	0,122 ^{n.s.}
	Essigsäure	41	0,140 ^{n.s.}
	Gesamtsäure	41	0,219 ^{n.s.}
	Alkohol	41	-0,164 ^{n.s.}
	Kohlenhydrate	41	-0,295 ^{n.s.}
	Cellulose	41	-0,464 ^{**}
	Hemicellulose	41	-0,234 ^{n.s.}
	Lignin	41	-0,466 ^{**}

n.s. = nicht signifikant, **p<0,01 (Dunnett-Test), n = Probenanzahl

8.8 Wirtschaftlichkeitsbetrachtung

Tab. 8-49: Enzymkosten der eingesetzten Enzympräparate

Enzympräparat	Einsatzmenge	Enzympreis	Enzymkosten
	[kg/t FM]	[€/kg]	[€/t FM]
Enzymatische Behandlung während der Silierung			
B3	4	18	72,00
B4	3,1	25	77,50
A3	0,07	120	8,40
A3	0,14	120	16,80
B4	0,07	25	1,75
B4	0,14	25	3,50
L	0,07	20 €/1000 U → 1000 U/1 g	-
ST	10	0,15	1,50
AS	10	0,15	1,50
Enzymatische Behandlung direkt vor dem Biogasprozess			
A3	0,35	120	42,00
B4	0,35	25	8,75
Enzymatische Behandlung während dem Biogasprozess			
A1	0,07	70	4,90
B1	0,07	25	1,75
L	0,07	20 €/1000 U → 1000 U/1 g	-
ST	10	0,15	1,50
AS	10	0,15	1,50

A1 = Cellulase, A3 = Cellulase, B3 = Cellulase, B1 = Pektinase, B4 = Pektinase, L = Laccase, ST = Shiitake, AS = Austernseitling

Tab. 8-50: Substratkosten pro erzeugter kWh_{el}

	Methanausbeute	Stromerzeugung	Substratbereit- stellungskosten ⁺	Enzymkosten	Substratkosten pro erzeugter kWh _{el}	Mehr- oder Minderbetrag
	[m ³ /t FM]	[kWh _{el} /t FM]	[€/t FM]	[€/t FM]	[Cent/kWh _{el}]	[Cent/kWh _{el}]
Enzymatische Behandlung während der Silierung						
Maissilage 4 mm	88	352	35	-	9,94	0
Maissilage + B3	91	364	35	72,00	29,40	-19,45
Maissilage + B4	70	280	35	77,50	40,18	-30,24
Maissilage + B3/B4	75	300	35	149,50	61,50	-51,56
Maissilage 8 mm	95	380	35	-	9,21	0
Maissilage + B3	103	412	35	72,00	25,97	-16,76
Maissilage + B4	112	448	35	77,50	25,11	-15,90
Maissilage + B3/B4	107	428	35	149,50	43,11	-33,90
Maissilage 4 mm	125	500	35	-	7,00	0
Maissilage + A3/B4	116	464	35	10,15	9,73	-2,73
Maissilage + A3/L	124	496	35	-	k.B.	k.B.
Maissilage + B4/L	106	424	35	-	k.B.	k.B.
Maissilage 8 mm	117	468	35	-	7,48	0
Maissilage + A3	104	416	35	8,40	10,43	-2,95
Maissilage + B4	102	408	35	1,75	9,01	-1,53
Maissilage + L	112	448	35	-	k.B.	k.B.
Maissilage + A3/B4	100	400	35	10,15	8,75	-1,27
Maissilage + A3/L	113	452	35	-	k.B.	k.B.
Maissilage + B4/L	110	440	35	-	k.B.	k.B.
Maissilage + A3/B4/L	109	436	35	-	k.B.	k.B.
Roggensilage 4 mm	87	348	48	-	13,79	0
Roggensilage + A3/B4	91	364	48	10,15	15,98	-2,18
Roggensilage + A3/L	88	352	48	-	k.B.	k.B.
Roggensilage + B4/L	90	360	48	-	k.B.	k.B.
Roggensilage 8 mm	91	364	48	-	13,19	0

	Methanausbeute	Stromerzeugung	Substratbereit- stellungskosten ⁺	Enzymkosten	Substratkosten pro erzeugter kWh _{el}	Mehr- oder Minderbetrag
	[m ³ /t FM]	[kWh _{el} /t FM]	[€/t FM]	[€/t FM]	[Cent/kWh _{el}]	[Cent/kWh _{el}]
Roggensilage + A3	88	352	48	8,40	16,02	-2,84
Roggensilage + B4	89	356	48	1,75	13,97	-0,79
Roggensilage + L	93	372	48	-	k.B.	k.B.
Roggensilage + A3/B4	101	404	48	10,15	14,39	-1,21
Roggensilage + A3/L	95	380	48	-	k.B.	k.B.
Roggensilage + B4/L	100	400	48	-	k.B.	k.B.
Roggensilage + A3/B4/L	116	464	48	-	k.B.	k.B.
Roggensilage 8 mm	84	336	48	-	14,29	0
Roggensilage + B4/L-1	78	312	48	-	k.B.	k.B.
Roggensilage + A3/B4-1	79	316	48	10,15	18,40	-4,12
Roggensilage + A3/B4/L-1	79	316	48	-	k.B.	k.B.
Roggensilage + B4/L-2	82	328	48	-	k.B.	k.B.
Roggensilage + A3/B4-2	91	364	48	20,30	18,76	-4,48
Roggensilage + A3/B4/L-2	88	352	48	-	k.B.	k.B.
Roggensilage + ST-1	93	372	48	1,50	13,31	+0,98
Roggensilage + AS-1	83	332	48	1,50	14,91	-0,62
Enzymatische Behandlung direkt vor dem Biogasprozess						
Roggensilage 8 mm	87	348	48	-	13,79	0
Roggensilage + E	95	380	48	50,75	25,99	-12,19
Enzymatische Behandlung während des Biogasprozesses						
Maissilage 4 mm	105	420	35	-	8,33	0
Maissilage + A1/B1	104	416	35	6,65	10,01	-1,68
Maissilage + A1/L	110	440	35	-	k.B.	k.B.
Maissilage + B1/L	106	424	35	-	k.B.	k.B.
Maissilage 8 mm	91	364	35	-	9,62	0
Maissilage + A1	93	372	35	4,90	10,73	-1,11
Maissilage + B1	99	396	35	1,75	9,28	+0,34
Maissilage + L	95	380	35	-	k.B.	k.B.

	Methanausbeute	Stromerzeugung	Substratbereit- stellungskosten ⁺	Enzymkosten	Substratkosten pro erzeugter kWh _{el}	Mehr- oder Minderbetrag
	[m ³ /t FM]	[kWh _{el} /t FM]	[€/t FM]	[€/t FM]	[Cent/kWh _{el}]	[Cent/kWh _{el}]
Maissilage + A1/B1	102	408	35	6,65	10,21	-0,59
Maissilage + A1/L	92	368	35	-	k.B.	k.B.
Maissilage + B1/L	101	404	35	-	k.B.	k.B.
Maissilage + A1/B1/L	102	408	35	-	k.B.	k.B.
Roggensilage 4 mm	107	428	48	-	11,21	0
Roggensilage + A1/B1	96	384	48	6,65	14,23	-3,02
Roggensilage + A1/L	102	408	48	-	k.B.	k.B.
Roggensilage + B1/L	101	404	48	-	k.B.	k.B.
Roggensilage 8 mm	97	388	48	-	12,37	0
Roggensilage + A1	98	392	48	4,90	13,49	-1,12
Roggensilage + B1	103	412	48	1,75	12,08	+0,30
Roggensilage + L	99	396	48	-	k.B.	k.B.
Roggensilage + A1/B1	97	388	48	6,65	14,09	-1,71
Roggensilage + A1/L	97	388	48	-	k.B.	k.B.
Roggensilage + B1/L	103	412	48	-	k.B.	k.B.
Roggensilage + A1/B1/L	106	424	48	-	k.B.	k.B.
Roggensilage 8 mm	84	336	48	-	14,29	0
Roggensilage + ST-2	83	332	48	1,50	14,91	-0,62
Roggensilage + AS-2	83	332	48	1,50	14,91	-0,62
Roggensilage 8 mm	87	348	48	-	13,79	0
Roggensilage + ST-3	91	364	48	1,50	13,60	+0,19
Roggensilage + ST-3/Rühren	94	376	48	1,50	13,16	+0,63
Roggensilage + AS-3	82	328	48	1,50	15,09	-1,30
Roggensilage + AS-3/Rühren	85	340	48	1,50	14,56	-0,77

⁺[nach KTBL 2011] Maissilage: 35 €/t FM bei 33 % TS, Roggen als Ganzpflanzensilage: 48 €/t FM bei 29,4 % TS; A1 = Cellulase, A3 = Cellulase, B3 = Cellulase, B1 = Pektinase, B4 = Pektinase, L = Laccase, ST-1 = Shiitake (1. Charge), AS-1 = Austernseitling (1. Charge), ST-2 = Shiitake (2. Charge), AS-2 = Austernseitling (2. Charge), ST-3 = Shiitake (3. Charge), AS-3 = Austernseitling (3. Charge), Enzym-1 = 0,07 g Enzym/kg Roggen, Enzym-2 = 0,14 g Enzym/kg Roggen, k.B. = keine Berechnung

Danksagung

Herrn Prof. Lockau, Herrn Prof. Westphal und Herrn Prof. Linke sei für die unkomplizierte Aufnahme als Promovendin sowie für die fachlichen und formellen Hinweise gedankt.

Ein herzlicher Dank gilt Herrn Dr. Köhler und dem gesamten Team des Instituts für Agrar- und Stadtökologische Projekte an der Humboldt-Universität zu Berlin (IASP) für die Aufnahme als Stipendiatin und das entgegengebrachte Vertrauen.

Den Projektpartnern des Biogas Crops Network (BCN) danke ich für ideenreiche und kritische Vortrags- und Diskussionsrunden, gemütliche Abende und die große Kooperationsbereitschaft.

Für zahlreiche Diskussionsrunden und wissenschaftliche Anregungen möchte ich insbesondere Herrn Dr. Valbuena, Herrn Dr. Schalow, Herrn Prof. Westphal und Herrn Pelenc danken. Ein besonderes Wort des Dankes möchte ich an Frau Dr. Sommerfeld richten, welche mich sehr freundlich an das Thema „Enzyme“ herangeführt sowie in die Methode der Enzymaktivitätsbestimmung eingearbeitet hat.

Dank gilt auch den fleißigen Helfern: Christine Fitzner, Sebastian Barthel, Raissa Nowasch und Katharina Witting. Ein großer Dank geht an alle Kollegen, welche mehrfach kurzfristig zur Silierung der Pflanzenrohstoffe bereitstanden.

Auch dem Gemeinschaftslabor der Humboldt-Universität gilt großer Dank. Mit Beharrlichkeit, Fleiß und kritischen Auswertungen wurden sehr viele chemische Untersuchungen bewältigt. Herrn Dr. Junge und Herrn Beifort von der ABiTEP GmbH sei für die Unterstützung bei der Probenvorbereitung gedankt.

Den Firmen ECA.biotech, DSM Food Specialties, Biopract GmbH, SternEnzym GmbH & Co. KG bzw. Pilzhof Dr. Schulz möchte ich für das Überlassen von Enzym- bzw. Pilzproben danken.

Für die Bereitschaft das Werk Korrektur zu lesen, danke ich insbesondere Herrn Prof. Westphal, Frau Susanne Herfort und Frau Hendrikje Schreiter. Herrn Steffen Krause sei für die Hilfe bei der Formatierung und die stetige Motivation gedankt.

Die dargestellten Ergebnisse sind Bestandteil des Verbundprojektes „Grundlagen der Biogasgewinnung aus pflanzlicher Biomasse: Systemanalyse der mikrobiologischen Stoffumwandlung unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses der Substratbereitstellung, der Intermediatbildung sowie der Prozessführung“ das von dem Projektträger Jülich (PTJ) mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert wurde.

Publikationsliste

Liste der Fachartikel:

Brulé M., Lemmer A., Oechsner H., Jungbluth T., Schimpf U. (2008): Einfluss der Zugabe von faserspaltenden Enzymen auf die Methanausbeute von Roggensilage. Landtechnik Jg. 63, Nr. 3, S. 178-179, ISSN 0023-8082

Schimpf U. (2008): Mehr Methan durch Enzyme. Teil I: Steigerung der Methanausbeute durch den Abbau von Lignocellulose während der Rohstoffsilierung. η [energie] Energieeffizienz und kohlenstoffarme Energietechnik 4, S. 53-55, ISSN 1866-528

Schimpf U. (2010): Mehr Gas mit Enzymen. Bauernzeitung, 24. W., 51. Jg., S. 32-33, 2010, ISSN 0941-2247

Schimpf U., Hanreich A., Mähnert P., Unmack T., Junne S. and Lopez-Ulibarri R. (2013): Improving the Efficiency of Large-Scale Biogas Processes – Pectinolytic Enzymes Accelerate the Lignocellulose Degradation. Journal of Sustainable Energy and Environment 4, pp. 53-60

Liste der Poster:

Schimpf U.; Valbuena R. (2007): Enzymatic degradation of lignocellulose during ensiling of maize to increase the methane yield in biogas production processes. The 3rd Glycan Forum, Berlin, 22.-23.2.2007

Schimpf U.; Valbuena R.: Untersuchungen zum Einsatz hydrolytischer und oxidativer Enzyme in Roggensilage zur Steigerung der Methanausbeute. 4. VDI-Fachtagung "Biogas - Energieträger der Zukunft", Berlin, 14.-15.6.2007

Schimpf U., Hanreich A., Unmack T., Mähnert P., Junne S., Lopez-Ulibarri R. (2011): Enzym-einsatz zur Methanertragssteigerung: Untersuchungen aus Labor und Praxis. 6. Fachtagung „Biogas 2011 – Energieträger der Zukunft“, Braunschweig, 8.-9.6.2011, In: VDI-Berichte 2121, S. 255-256, ISBN 978-3-18-092121-1

Liste der Vorträge:

Schimpf U. (2007): Einsatz von Enzymen bei der Silierung - Auswirkungen auf den Biogas-ertrag. Gemeinschaftsveranstaltung "Biogas - Schwerpunkt: Energiepflanzen", Landesanstalt für Landwirtschaft, Forsten und Gartenbau in Sachsen-Anhalt, 27.3.2007

Schimpf U. (2007): Enzymatic degradation of lignocellulose during ensiling of rye and maize to increase the methane yield in biogas production processes. V International Conference for Renewable Energy, Energy Saving and Energy Education, CIER 2007, Havanna, Cuba, 22.-25.5.2007, ISBN 978-959-282-051-7

Schimpf U. (2008): Untersuchungen zur Wirkung von technischen Enzympräparaten im Biogasprozess. KoNaRo-Fachgespräch „Einsatz von Prozesshilfsstoffen zur Steigerung des Biogasertrages“, Landesanstalt für Landwirtschaft, Forsten und Gartenbau in Sachsen-Anhalt, 6.11.2008

Schimpf U., Valbuena R. (2009): Effizienzsteigerung der Biomethanisierung durch Enzymzusätze. Abschluss-Symposium des Biogas Crops Network (BCN): „Wieviel Biogas steckt in Pflanzen“, Potsdam, 7.5.2009, In: Bornimer Agrartechnische Berichte, Heft 68, S. 44-56, ISSN 0947-7314

Häbler J., Schimpf U., Tölle R. (2010): Effizienzsteigerung durch optimierte Silierung. 19. Jahrestagung Fachverband Biogas e.V., Leipzig, 2.-4.2.2010, In: Tagungsband der 19. Jahrestagung Fachverband Biogas e.V.: Biogas - die Energie künftiger Generationen, S. 95-102

Schimpf U. (2010): Lignocellulosic enzyme potential for a more effective methane production by the utilization of fiber rich substrates in the biogas process. Workshop CELALE, UNISUL, Florianopolis, Brasilien, 17.-19.3.2010

Schimpf U. (2011): Enzymatische Aufbereitung von Biogassubstraten. Infotag Biogas, KfL Löwenberg, 27.1.2011

Schimpf U., Hanreich A., Mähnert P., Unmack T., Junne S., Lopez-Ulibarri R. (2012): Improving the efficiency of large-scale biogas processes – Pectinolytic enzymes for an accelerated lignocellulose degradation. 4th International Conference on Sustainable Energy and Environment (SEE 2011): A Paradigm Shift to Low Carbon Society, Bangkok, Thailand, 27.-29.2.2012, ISBN: 978-616-202-575-4

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt,

dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Zuhilfenahme unerlaubter Hilfsmittel angefertigt habe, dass ich mich nicht anderwärts um einen Doktorgrad beworben habe und dass ich die zugrunde liegende Promotionsordnung vom 27. Juni 2012 kenne.